

## **INFORMATION TO USERS**

This manuscript has been reproduced from the microfilm master. UMI films the text directly from the original or copy submitted. Thus, some thesis and dissertation copies are in typewriter face, while others may be from any type of computer printer.

**The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.** Broken or indistinct print, colored or poor quality illustrations and photographs, print bleedthrough, substandard margins, and improper alignment can adversely affect reproduction.

In the unlikely event that the author did not send UMI a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if unauthorized copyright material had to be removed, a note will indicate the deletion.

Oversize materials (e.g., maps, drawings, charts) are reproduced by sectioning the original, beginning at the upper left-hand corner and continuing from left to right in equal sections with small overlaps.

Photographs included in the original manuscript have been reproduced xerographically in this copy. Higher quality 6" x 9" black and white photographic prints are available for any photographs or illustrations appearing in this copy for an additional charge. Contact UMI directly to order.

ProQuest Information and Learning  
300 North Zeeb Road, Ann Arbor, MI 48106-1346 USA  
800-521-0600

**UMI<sup>®</sup>**

**Université de Sherbrooke**

**Caractérisation de la région promotrice du gène *CYP11B2* de hamster**

**par**

**Philippe Sarazin**

**Département de Biochimie**

**Mémoire présenté à la Faculté de médecine**

**en vue de l'obtention du grade de**

**Maître ès sciences (M.Sc.) en Biochimie**

**Janvier 2000**

**© Philippe Sarazin, 2000**



**National Library  
of Canada**

**Acquisitions and  
Bibliographic Services**

**395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada**

**Bibliothèque nationale  
du Canada**

**Acquisitions et  
services bibliographiques**

**395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada**

*Your file Votre référence*

*Our file Notre référence*

**The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.**

**The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.**

**L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.**

**L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.**

**0-612-61834-X**

**Canada**

## TABLE DES MATIÈRES

<b>LISTE DES ILLUSTRATIONS</b>	<b>III</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b>	<b>V</b>
<b>RÉSUMÉ</b>	
<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>1. LE CORTEX SURRÉNALIEN</b>	<b>1</b>
1.1 Historique	1
1.2 Types cellulaires du cortex surrénalien	2
<b>2. BIOSYNTHÈSE DES STÉROÏDES DE LA GLANDE SURRÉNALE</b>	<b>3</b>
2.1 Historique	3
2.2 Structure du cholestérol, le précurseur des stéroïdes	4
2.3 Sources de cholestérol pour la stéroïdogénèse surrénalienne	5
2.4 Le minéralocorticoïde aldostérone	6
<b>3. VOIE DE SYNTHÈSE DE L'ALDOSTÉRONE</b>	<b>7</b>
3.1 P450scc	9
3.2 3 $\beta$ -Hydroxystéroïde déshydrogénase	10
3.3 P450c21	11
3.4 P450c11	11
3.5 P450aldo	12
<b>4. RÉGULATION DE LA SYNTHÈSE DE L'ALDOSTÉRONE</b>	<b>12</b>
4.1 Régulation de l'expression génétique chez les eucaryotes	14
4.2 Régulation de l'activité promotrice de gènes codant pour des enzymes stéroïdiennes	17
4.3 Régulation de l'activité promotrice du gène <i>CYP11B2</i>	21
4.4 Objectifs de la recherche	24

<b>RÉSULTATS</b>	<b>25</b>
<b>1. CHAPITRE 1:</b>	<b>25</b>
1.1 ARTICLE: Characterisation of the enhancing regulatory region of the hamster <i>CYP11B2</i> gene	25
Abstract	27
Introduction	29
Experimental procedures	31
Results	34
Discussion	38
Acknowledgements	41
References	42
<b>2. CHAPITRE 2:</b>	<b>51</b>
2.1 Introduction	51
2.2 Matériel et méthodes	52
2.2.1 Construction des mutants de délétion	52
2.3 Résultats	53
2.3.1 Expression de l'activité transcriptionnelle basale et stimulée de promoteurs tronqués du gène <i>CYP11B2</i>	53
<b>DISCUSSION</b>	<b>59</b>
<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>67</b>
<b>RÉFÉRENCES</b>	<b>68</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>74</b>

## LISTE DES ILLUSTRATIONS

### **INTRODUCTION**

Figure 1. Structure cellulaire du cortex surrénalien.	3
Figure 2. Structure du noyau cyclopentanoperhydrophenanthrene indiquant la numérotation de chaque atome de carbone.	5
Figure 3. Voies métaboliques de la stéroïdogénèse surrénalienne chez l'humain.	8
Figure 4. Schéma représentant la régulation de la sécrétion d'aldostérone chez les mammifères.	13
Figure 5. Représentation schématique du promoteur du gène <i>CYP11B2</i> de hamster.	23

### **RÉSULTATS**

#### **1. CHAPITRE 1**

Figure 1. Time course of <i>CYP11B2</i> reporter gene induction and aldosterone secretion.	46
Figure 2. Schematic representation of the 5'-flanking region of the hamster <i>CYP11B2</i> gene.	47
Figure 3. Analysis of putative Ad1, Ad2 and -114/-124 elements within the hamster <i>CYP11B2</i> promoter.	48
Figure 4. Two double mutations in Ad2/-114/-124 and in Ad2/-143/-161 of the hamster <i>CYP11B2</i> promoter.	49
Figure 5. Effects of nifedipine on the hamster <i>CYP11B2</i> gene transcriptional activity.	50

## 2. CHAPITRE 2

Figure 6. Représentation schématique des 4 constructions plasmidiques étudiées.	51
Figure 7. Activité transcriptionnelle basale obtenue avec les différentes constructions plasmidiques du gène <i>CYP11B2</i> de hamster.	54
Figure 8. Activités transcriptionnelles basales et stimulées à l'AII, au KCl et à l'AMPc obtenues avec les différentes constructions plasmidiques du gène <i>CYP11B2</i> de hamster.	55
Figure 9. Activité transcriptionnelle basale obtenue avec les différentes constructions plasmidiques du gène <i>CYP11B2</i> de hamster.	57
Figure 10. Activités transcriptionnelles basales et stimulées à l'AII, au KCl et à l'AMPc obtenues avec les différentes constructions plasmidiques du gène <i>CYP11B2</i> de hamster.	58

## DISCUSSION

Figure 11. Représentation schématique des protéines transcriptionnelles basales d'un promoteur eucaryote typique.	64
---	----

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACTH	hormone adrénocorticotropine
Ad4BP	protéine liant Ad4
Ang	angiotensine II
ANP	<i>atrial natriuretic peptide</i>
ASP	<i>adrenal specific protein</i>
AT <sub>1</sub>	récepteur à l'Ang de type I
ATF	<i>activating transcription factor</i>
CAT	chloramphénicol acétyl transférase
CBP	<i>CREB-binding protein</i>
COUP-TF	<i>chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor</i>
CRE	élément de réponse à l'AMPc
CREB	protéine liant CRE
CRS	<i>cAMP responding sequence</i>
<i>CYP11A1</i>	gène codant pour le cytochrome P450 <sub>scc</sub>
<i>CYP11B1</i>	gène codant pour le cytochrome P450 <sub>c11</sub>
<i>CYP11B2</i>	gène codant pour le cytochrome P450 <sub>aldo</sub>
<i>CYP17</i>	gène codant pour le cytochrome P450 <sub>c17</sub>
<i>CYP21A2</i>	gène codant pour le cytochrome P450 <sub>c21</sub>
<i>CYP21A1P</i>	pseudogène codant pour le cytochrome P450 <sub>c21</sub>
dBt cAMP	dibutyl adénosine monophosphate cyclique
DHEAS	déshydroépiandrostérone sulfaté
DNase I	désoxyribonucléase I
DOC	désoxycorticostérone
LDL	<i>low-density lipoprotein</i>
P450 <sub>scc</sub>	cytochrome P450 side chain cleavage
P450 <sub>c17</sub>	cytochrome P450 17 $\alpha$ -hydroxylase
P450 <sub>c21</sub>	cytochrome P450 21-hydroxylase
P450 <sub>c11</sub>	cytochrome P450 11 $\beta$ -hydroxylase
3 $\beta$ -HSD	3 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase
P450 <sub>aldo</sub>	cytochrome P450 aldostérone synthase
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
PKA	protéine kinase A
StAR	<i>Steroidogenic acute regulatory protein</i>



## RÉSUMÉ

La biosynthèse de l'aldostérone dans la zone glomérulée du cortex surrénalien requiert l'action séquentielle de plusieurs enzymes. L'étape finale de cette synthèse est contrôlée chez certaines espèces par l'enzyme P450 11 $\beta$ -hydroxylase, exprimée par le gène *CYP11B1* (vache, porc et mouton), alors qu'elle est plutôt contrôlée chez d'autres espèces par l'enzyme P450 aldostérone synthase, exprimée par le gène *CYP11B2* (rat, souris, hamster et humain).

Les effets de l'angiotensine II (AII), du KCl et du dBt cAMP sur l'expression d'un plasmide contenant les 486 premières paires de bases (pb) de la région 5' non codante du gène *CYP11B2* de hamster ont été étudiés dans la lignée cellulaire NCI-H295. L'activité basale du promoteur augmente progressivement en accroissant la longueur des plasmides de délétion jusqu'à -167 pb de la région 5' non codante pour décroître par la suite. Des éléments localisés dans les premières 167 pb du promoteur, nommés Ad1, Ad2 ainsi que les régions -114/-124 et -143/-161, ont été mutés respectivement pour ensuite déterminer leur importance dans la régulation positive de l'activité promotrice.

L'activité promotrice basale du mutant Ad1 (mAd1) a été diminuée au niveau de celle d'un plasmide contrôle ne contenant aucun promoteur *CYP11B2* et cette mutation a complètement aboli les effets stimulateurs de l'AII, du KCl et du dBt cAMP. L'activité promotrice basale du mutant Ad2 (mAd2) a été atténuée de 50-80%, mais l'AII a tout de même stimulé son activité avec un facteur similaire à celui retrouvé pour le promoteur de type sauvage. Par contre, les facteurs de stimulation du KCl et du dBt cAMP sur l'activité de mAd2 ont tous été atténués de façon significative. L'activité promotrice basale du mutant -114/-124 (m-114/-124) a été atténuée de 53-68%, mais cette activité était toujours stimulée par l'AII, le KCl et le dBt cAMP avec des facteurs respectivement similaires à ceux retrouvés pour le promoteur sauvage. Comparées au mAd2, les doubles mutations mAd2/m-114/-124 et mAd2/m-143/-161 ont résulté en baisses additionnelles de 35% et 33% respectivement de l'activité promotrice basale. La présence de deux éléments *cis*, régulant négativement l'activité promotrice, a été révélée dans la région comprise entre -167 et -486 pb.

Dans l'ensemble, ces résultats démontrent que l'élément Ad1 est essentiel pour l'activité promotrice du gène *CYP11B2* de hamster. L'élément Ad2 et la région -114/-124 sont également requis pour l'obtention d'une activité basale maximale alors que la présence d'Ad2 est nécessaire pour obtenir une induction maximale en réponse au dBt cAMP et au KCl dans les cellules NCI-H295.

De plus, l'utilisation de la nifédipine, un antagoniste des canaux calciques, a permis de démontrer la participation de ces canaux dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de *CYP11B2* dans les cellules NCI-H295. La nifédipine a partiellement bloqué les effets stimulateurs de l'AII, du dBt cAMP et de la forskoline sur l'activité transcriptionnelle du promoteur de type sauvage de -486 pb, alors qu'elle a complètement bloqué les effets stimulateurs du KCl. Ces résultats démontrent donc l'implication des canaux calciques dans la régulation de la transcription du gène *CYP11B2* par le KCl, et leur implication partielle dans les mécanismes de régulation de l'AII, du dBt cAMP et de la forskoline sur ce même gène.

## INTRODUCTION

### 1. LE CORTEX SURRÉNALIEN

#### 1.1 Historique

L'anatomie des glandes surrénaliennes semble avoir été décrite pour la première fois en 1563 par Eustachius dans sa *Tabulae Anatomicae*, publiée en 1714 (Lancisius, 1774). Par la suite, plusieurs études ont permis de différencier le cortex de la médullaire (Schoenwetter, 1968), soient deux glandes endocrines de la surrénale ayant des fonctions très distinctes. Les trois zones concentriques du cortex surrénalien ont ensuite été nommées: glomerulosa, fasciculata et reticularis (Arnold, 1866).

Les idées sur la fonction des glandes surrénaliennes ont tardé à être bien définies. Les premières évidences pour un rôle physiologique central de ces glandes sont venues à partir d'observations cliniques de Thomas Addison en 1855, qui décrivit les symptômes de l'insuffisance surrénale chronique (Addison, 1855). Une année plus tard, Charles Brown-Séquard démontra chez plusieurs espèces animales les conséquences fatales de la surrénalectomie (Brown-Séquard, 1856).

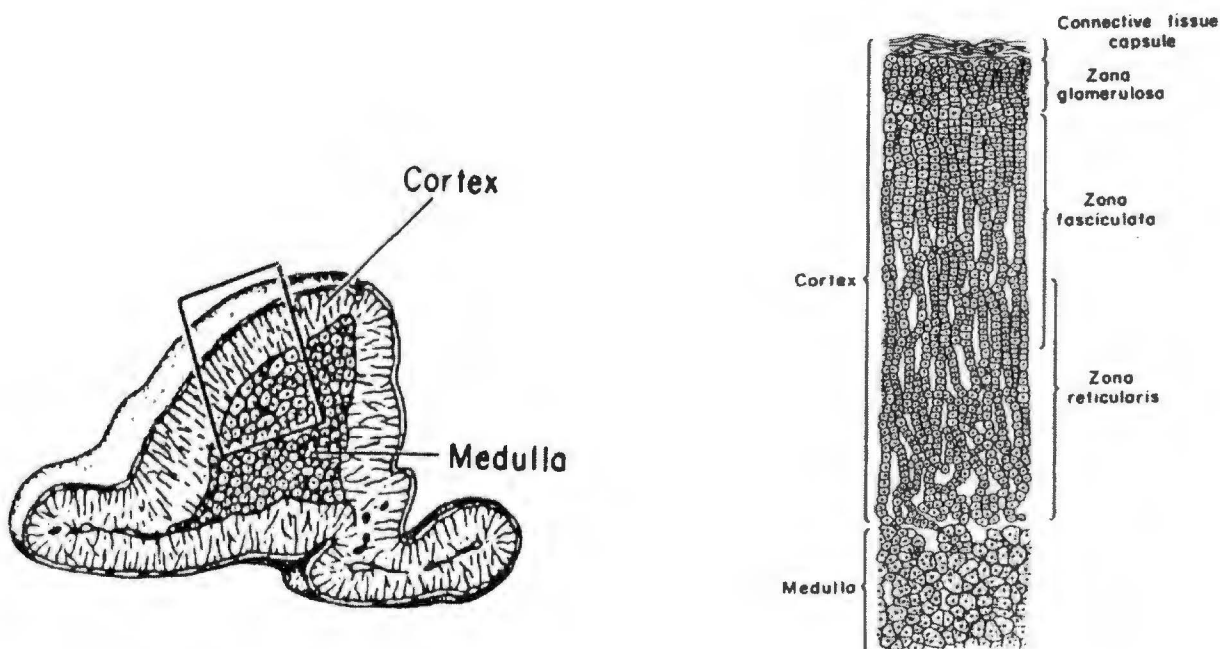
L'importance du cortex surrénalien par rapport à la médullaire a fait l'objet d'un débat important jusqu'au début du 20<sup>e</sup> siècle. L'issue a été clarifiée pour la plupart des scientifiques de l'époque par la démonstration suivante: l'ablation chez le chien d'une glande surrénale et de la moitié de l'autre en combinaison avec la cautérisation de la médullaire de la surrénale restante résultait en espèces vivantes et en santé (Wheeler et

Vincent, 1917). Néanmoins ce n'est que plusieurs années plus tard, avec les études du rôle physiologique des stéroïdes surrénaliens, que tous les scientifiques furent convaincus de l'importance vitale du cortex.

## **1.2 Types cellulaires du cortex surrénalien**

L'organisme possède deux glandes surrénales, chacune disposées sur le pôle supérieur des reins. Chaque glande est encaissée dans un mince tissu conjonctif et une épaisse capsule fibreuse. Les surrénales droites et gauches sont situées légèrement différemment sur chaque rein en raison de la présence de structures anatomiques avoisinantes différentes.

La division du cortex en trois zones concentriques distinctes a été basée sur des différences dans la structure des vaisseaux sanguins et du tissu conjonctif de chaque zone (Arnold, 1866) (Figure 1). La zone glomérulée, située tout juste sous la capsule externe, constitue environ 15% du cortex. Elle est responsable de la synthèse et de la sécrétion des minéralocorticoïdes, dont l'aldostérone. La zone fasciculée, constituant 75% du cortex, est responsable en majeure partie de la sécrétion des glucocorticoïdes, dont le cortisol chez l'humain, et en moindre partie de la sécrétion d'androgènes. La zone réticulée, en contact avec la médullaire, sécrète exclusivement des androgènes, dont le déshydroépiandrostérone sulfaté (DHEAS).



**FIGURE 1:** Structure cellulaire du cortex surrénalien. (Hadley Mac E. (1988). Endocrinology. 2<sup>nd</sup> edition, Prentice-Hall)

## **2. BIOSYNTHÈSE DES STÉROÏDES DE LA GLANDE SURRÉNALE**

### **2.1 Historique**

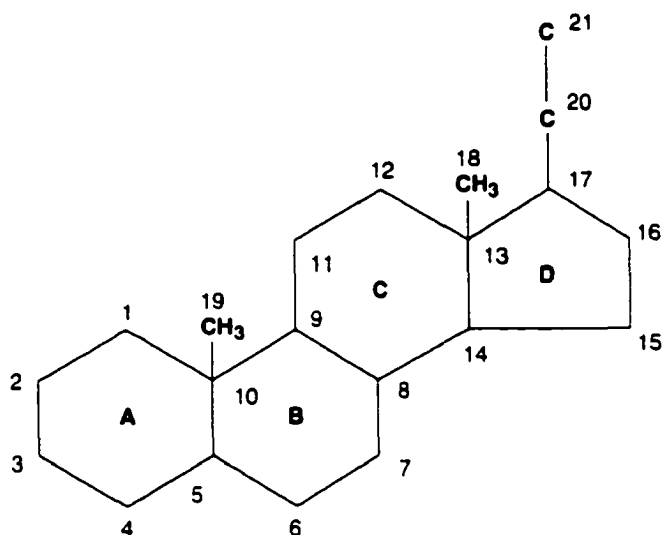
Au début du 20<sup>e</sup> siècle, les études quant aux rôles physiologiques des stéroïdes ont été très difficiles à mener étant donné la contamination des extraits avec les catécholamines de la médullaire. Le point tournant est survenu en 1930, alors qu'il a été démontré que des extraits lipidiques du cortex surrénalien étaient capable de permettre la croissance normale de chats surrénalectomisés (Swingle et Pfiffner, 1931). L'isolation, l'identification et la synthèse des différents stéroïdes ont débuté par la suite. La structure de l'oestrone a été élucidée en 1932, suivie de celle de la progestérone en

1934, de la testostérone en 1935 et de l'aldostérone en 1953. Jusqu'à maintenant, plus d'une trentaine de stéroïdes ont été découverts dans les différents tissus stéroïdogéniques et plusieurs de leurs rôles demeurent encore à élucider.

La synthèse de stéroïdes synthétiques depuis 1949 a aussi permis de comprendre davantage la fonction de la glande surrénale et de ses produits. Entre autres, la synthèse de stéroïdes très puissants (prednisone, prednisolone, dexaméthasone, fludrocortisone, etc.) et le développement d'inhibiteurs de leur synthèse (metyrapone et ketoconazole) ont permis de développer des applications thérapeutiques, diagnostiques et expérimentales très importantes.

## **2.2 Structure du cholestérol, le précurseur des stéroïdes**

Les stéroïdes du cortex surrénalien originent tous d'un même précurseur, soit le cholestérol. Sa structure consiste en un noyau cyclopentanoperhydrophenanthrene (Figure 2), comprenant trois cycles à 6 atomes de carbone et un cycle à 5 atomes de carbone, et une chaîne latérale hydrophobe à 8 atomes de carbone.



**FIGURE 2:** Structure du noyau cyclopentanoperhydrophenanthrene indiquant la numérotation de chaque atome de carbone.

### **2.3 Sources de cholestérol pour la stéroïdogénèse surrénalienne**

Les cellules des tissus stéroïdogéniques peuvent utiliser trois sources de cholestérol différentes. Chez l'homme, la plus importante (80%) provient des lipoprotéines plasmatiques circulantes, soient les *low-density lipoprotein* (LDL) (Gwynne et Strauss, 1982). Ces LDL se lient à des récepteurs spécifiques situés à la surface cellulaire et sont ensuite internalisées par endocytose. Elles fusionnent avec les lysozymes, desquels les esters de cholestérol sont hydrolysés, libérant ainsi le cholestérol servant de substrat stéroïdogénique. La deuxième source provient du cholestérol estérifié emmagasiné dans les vésicules lipidiques intracellulaires qui pourra être hydrolysé pour donner du cholestérol libre. Finalement, la dernière source, beaucoup moins importante, provient de la synthèse *de novo* à partir de l'acétate (Bolté *et al*, 1967). Ces

deux dernières sources constituent environ 20% du cholestérol total utilisé par les cellules stéroïdogéniques.

#### **2.4. Le minéralocorticoïde aldostérone**

Le cortex surrénalien des mammifères produit trois types différents d'hormones stéroïdiennes: les glucocorticoïdes, les minéralocorticoïdes et les androgènes. Alors que les androgènes provenant directement des surrénales semblent plutôt avoir un rôle physiologique significatif chez la femelle et négligeable chez le mâle, les glucocorticoïdes et les minéralocorticoïdes sont clairement reconnus comme étant essentiels au maintien de la vie et au contrôle du métabolisme du corps, indépendamment du sexe. Malgré leur importance physiologique respective, il existe plusieurs différences quantitatives entre les glucocorticoïdes (cortisol et corticostérone) et les minéralocorticoïdes (aldostérone). Chez l'humain, la production quotidienne de cortisol par le cortex est environ 300 fois plus élevée que celle de l'aldostérone (Müller, 1995). De plus, étant donné sa production plus élevée et sa liaison plus forte à une protéine circulante (*cortisol-binding globulin*), la concentration plasmatique de cortisol est 2000 fois plus élevée que celle de l'aldostérone. Donc, en comparaison au cortisol, l'aldostérone est clairement une hormone minoritaire du cortex surrénalien et son action spécifique est dépendante de plusieurs mécanismes (voir Müller, 1995).

La fonction principale de l'aldostérone consiste à réguler l'équilibre homéostatique des électrolytes du corps. Cette action est accomplie par réabsorption d'ions sodium ( $\text{Na}^+$ ) au niveau du rein en échange d'ions potassium ( $\text{K}^+$ ) et hydrogène ( $\text{H}^+$ ). Par



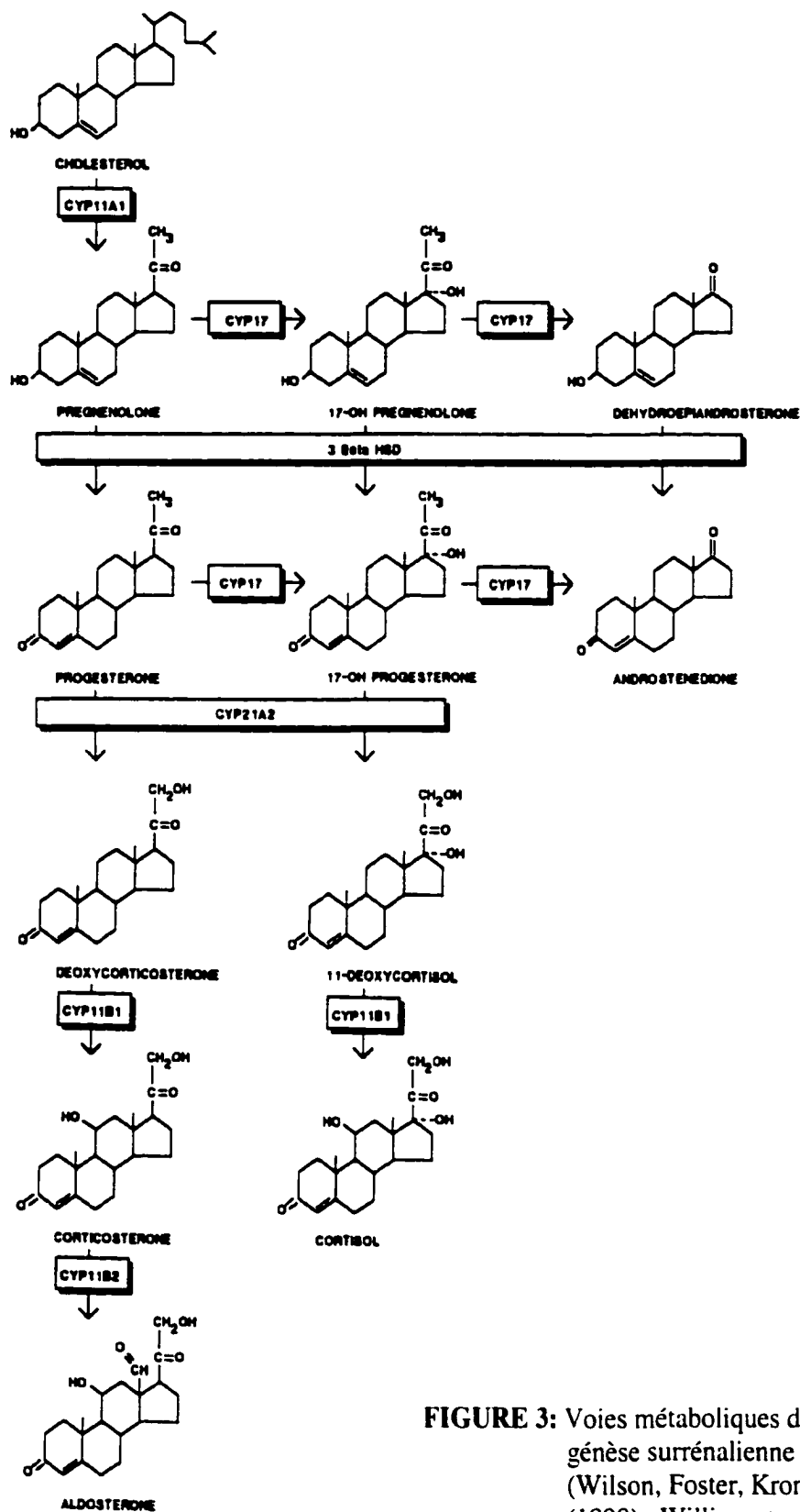
conséquent, les minéralocorticoïdes sont directement impliqués dans la régulation du volume sanguin et de la pression artérielle. C'est pourquoi la régulation de sa sécrétion et son mécanisme d'action constituent un champ d'études des plus importants depuis une cinquantaine d'années.

### **3. VOIE DE SYNTHÈSE DE L'ALDOSTÉRONE**

La biosynthèse générale des stéroïdes de la surrénale requiert la participation de quatre à cinq enzymes CYP selon les espèces. Les enzymes CYP sont une famille d'enzymes oxydatives ayant un pic maximal d'absorbance caractéristique à 450 nm lorsque réduites et liées au monoxyde de carbone (Miller, 1988). Quatre de ces enzymes CYP sont retrouvées chez tous les mammifères, soient CYP11A1 (P450<sub>scc</sub>), CYP17 (P450<sub>c17</sub>), CYP21A2 (P450<sub>c21</sub>) et CYP11B1 (P450<sub>c11</sub>) ainsi qu'une cinquième enzyme nommée 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase (3β-HSD) (Figure 3). De plus, une enzyme CYP supplémentaire ayant une séquence en acides aminés homologue à 90% à celle de CYP11B1, nommée CYP11B2 (P450<sub>aldo</sub>) (Mornet *et al.*, 1989), est retrouvée chez plusieurs espèces (humain, hamster, souris et rat).

Donc, selon leur expression et leur stabilité respectives dans chacune des zones du cortex surrénalien, il y aura contrôle très précis de la production de chacun des stéroïdes.

La biosynthèse de l'aldostérone par le cortex surrénalien nécessite la participation séquentielle de quatre enzymes. Les trois premières, utilisées chez tous les



**FIGURE 3:** Voies métaboliques de la stéroïdogenèse surrénalienne chez l'humain. (Wilson, Foster, Kronenberg, Larsen (1998). Williams textbook of endocrinology. 9<sup>th</sup> Edition, WB Saunders C<sup>ie</sup>)

mammifères, sont le P450<sub>scc</sub>, la 3 $\beta$ -HSD et le P450<sub>c21</sub>. Selon les espèces, l'étape finale de sa synthèse est contrôlée soit par le cytochrome P450<sub>c11</sub> ou par le cytochrome P450<sub>aldo</sub>. Chez le bovin (Morohashi *et al*, 1990), le porc (Yanagibashi *et al*, 1986) et le mouton (Boon *et al*, 1995), c'est le P450<sub>c11</sub>, aussi impliqué dans l'étape finale de la production des glucocorticoïdes, qui est responsable de la formation de l'aldostérone. Quant à l'humain (Mornet *et al*, 1989), au rat (Imai *et al*, 1990), à la souris (Domalik *et al*, 1991) et au hamster (LeHoux *et al*, 1994), c'est le cytochrome P450<sub>aldo</sub>, exprimé exclusivement dans la zone glomérulée, qui est responsable de la transformation de la désoxycorticostérone (DOC) en aldostérone.

### **3.1 P450<sub>scc</sub>**

L'étape limitante de la stéroïdogénèse consiste au transport du cholestérol à partir du cytosol vers la surface de la membrane mitochondriale interne. C'est à cet endroit que l'on retrouve le cytochrome P450<sub>scc</sub>, responsable de la catalyse de la première étape de la stéroïdogénèse. Quantité de facteurs semblent contribuer à activer ce transport, dont une protéine appelée *sterol carrier protein-2* (SCP-2) (Chanderbhan *et al*, 1983), le récepteur périphérique benzodiazepine (Papadopoulos *et al*, 1991) et la protéine StAR (*Steroidogenic acute regulatory protein*) (Lin *et al*, 1995).

La catalyse complète de la réaction provoquant la conversion du cholestérol en prégnénolone implique trois réactions successives. Pendant plusieurs années, les scientifiques pensaient que trois enzymes différentes étaient impliquées. Par la suite, il

a été démontré qu'une seule enzyme, le cytochrome P450<sub>sc</sub>, possédait les trois activités: soient la 20 $\alpha$ -hydroxylation, la 22- hydroxylation et la 20,22-lyase (Wang et Kimura, 1976).

Les déficiences génétiques reliées au P450<sub>sc</sub> entraînent une hyperplasie lipoïde de la surrénale alors que la biosynthèse de tous les stéroïdes surrénaliens est bloquée. Tous les sujets ont à la naissance un phénotype féminin et la déficience génétique est fatale à court terme.

### **3.2 3 $\beta$ -Hydroxystéroïde déshydrogénase**

Par la suite, la prégnénolone nouvellement formée est transportée vers le reticulum endoplasmique où elle sera convertie en progestérone par la 3 $\beta$ -HSD. Cette enzyme catalyse deux réactions distinctes: premièrement, une déshydrogénation du groupe hydroxyle en position 3 et deuxièmement, une isomérisation du double lien au carbone 5 (Rhéaume *et al*, 1991).

Le déficit en 3 $\beta$ -HSD réalise une ambiguïté sexuelle chez les deux sexes. Il y a accumulation de prégnénolone et de ses dérivés hydroxylés, dont le DHEA et le DHEAS. Le faible pouvoir androgénique de ces derniers composés explique la virilisation discrète des filles. Quant à une déficience complète en 3 $\beta$ -HSD, elle entraîne une hyperplasie congénitale des surrénales fatale pour les nouveau-nés.

### **3.3 P450c21**

L'enzyme P450c21, également retrouvée au niveau du reticulum endoplasmique (Kominami *et al*, 1980), possède une activité 21-hydroxylase permettant la conversion de la progestérone en DOC. Deux gènes encodant des enzymes ayant une activité 21-hydroxylase sont retrouvés sur le chromosome 6 (White *et al*, 1984). Seulement l'un d'eux, *CYP21A2*, est fonctionnel chez l'humain, l'autre étant un pseudogène (*CYP21A1P*) (White *et al*, 1984).

Une déficience en P450c21 s'accompagne d'une synthèse accrue des androgènes et par conséquent, d'une très forte virilisation. Une insuffisance minéralotrope est également observée due à une déficience en minéralocorticoïdes.

### **3.4 P450c11**

Le cytochrome P450c11, exprimé chez la plupart des espèces uniquement au niveau des cellules des zones fasciculées et réticulées, est responsable de la production des glucocorticoïdes. Par contre, comme mentionné précédemment, quelques particularités se présentent chez certaines espèces animales (bovin, porc et mouton). Chez ces dernières, le cytochrome P450c11 est exprimé dans les trois zones du cortex surrénalien et il possède également l'activité 18-oxydase permettant la conversion de la 18-hydroxy-corticostérone en aldostérone. Plusieurs études restent à faire pour déterminer pourquoi l'aldostérone est formée uniquement au niveau de la zone glomérulée chez ces espèces.

Une déficience en P450c11 provoque une légère virilisation et une hypertension attribuée à l'hypersécrétion de DOC.

### **3.5 P450aldo**

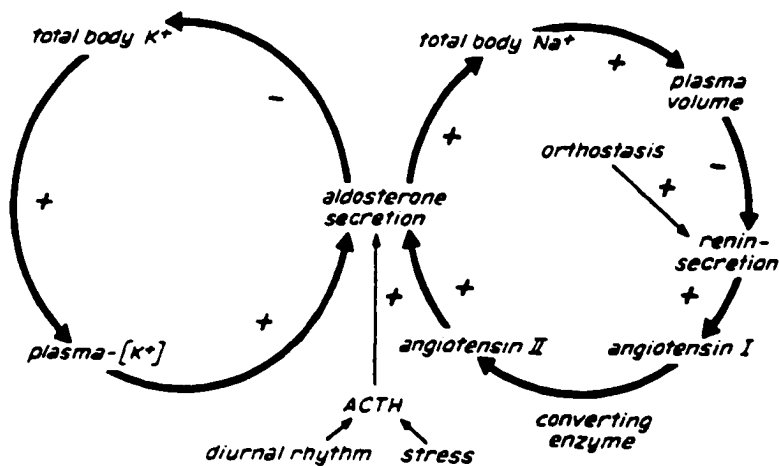
Le cytochrome P450 aldostérone synthase, exprimé uniquement au niveau de la zone glomérulée, permet la catalyse des trois étapes finales de la conversion de la DOC en aldostérone par ses activités 11 $\beta$ -hydroxylase, 18-hydroxylase et 18-oxydase (Curnow *et al*, 1991). Il est encodé à partir du gène *CYP11B2*, homologue à 95% au gène *CYP11B1* encodant le cytochrome P450c11 (Momet *et al*, 1989).

Les déficiences en P450aldo affectent uniquement la voie de synthèse de l'aldostérone et elles se manifestent donc par une symptomatologie d'insuffisance minéralotrope.

## **4. RÉGULATION DE LA SYNTHÈSE DE L'ALDOSTÉRON**

La sécrétion de l'aldostérone est gouvernée par plusieurs facteurs exerçant des interactions régulatrices très complexes. Les régulateurs majeurs contrôlant sa sécrétion sont le système rénine-angiotensine et les ions potassium, alors que l'hormone adrénocorticotropine (ACTH), la vasopressine, la dopamine, l'*atrial natriuretic peptide* (ANP), les agents  $\beta$ -adrénergiques, la sérotonine et la somatostatine sont des modulateurs mineurs.

Étant donné l'implication majeure de l'aldostérone dans l'homéostasie du sodium et du potassium, sa biosynthèse est adaptée continuellement aux variations de concentration de ces électrolytes. Un modèle du mécanisme physiologique de cette adaptation est montré à la figure 4 (Müller, 1988).



**FIGURE 4:** Schéma représentant la régulation de la sécrétion d'aldostérone chez les mammifères (Müller, 1988).

Premièrement, une concentration extracellulaire élevée en potassium stimule directement la production d'aldostérone, alors qu'un excès de ce dernier mène à une

perte en potassium et à l'hypocalcémie. L'effet des différentes concentrations en sodium sur la sécrétion d'aldostérone est un processus beaucoup plus complexe. Il implique des changements en volume plasmatique et le système rénine-angiotensine. La rénine est une enzyme synthétisée par le rein clivant un substrat produit par le foie, soit l'angiotensinogène. Le décapeptide produit, l'angiotensine I, est clivé au niveau des poumons par l'enzyme de conversion, pour former l'angiotensine II. C'est ce dernier composé qui stimule les cellules de la zone glomérulée qui produiront ainsi une plus grande quantité d'aldostérone.

L'ACTH, un dérivé du précurseur pro-opiomélanocortine (POMC), est un autre facteur influençant la sécrétion d'aldostérone. Par contre, son action sur la production des glucocorticoïdes dans la zone fasciculée est beaucoup plus forte. De plus, son effet sur la sécrétion d'aldostérone n'est que transitoire. L'absence d'action prolongée semble résulter d'un effet direct sur les cellules de la zone glomérulée, telles qu'une régulation à la baisse des récepteurs à l'ACTH ou une modification du signal de transduction suite à la liaison hormone-récepteur (Abayasekara *et al*, 1989).

#### **4.1 Régulation de l'expression génétique chez les eucaryotes**

Chez les eucaryotes, l'initiation de la transcription est un point majeur régulant le contrôle de l'expression génétique. Comparée aux procaryotes, trois thèmes généraux concernant cette régulation diffèrent chez les eucaryotes. Premièrement, l'activation de la transcription est dépendante de plusieurs changements dans la structure de la chromatine dans la région transcrite. Deuxièmement, même si des éléments régulateurs



positifs et négatifs sont retrouvés tout comme chez les procaryotes, les mécanismes régulateurs positifs prédominent dans les différents systèmes caractérisés jusqu'à maintenant. Finalement, une troisième distinction significative vient de la séparation physique existant entre la transcription, survenant au noyau, et la traduction, survenant au niveau du cytoplasme.

Les effets de la structure chromosomale sur la régulation des gènes sont très particuliers aux eucaryotes. De multiples changements structuraux peuvent être observés dans les régions chromosomales étant activées pour la transcription. Le plus évident est une augmentation de la sensibilité de l'ADN à une dégradation par des nucléases. En général, des nucléases telles la DNase I digèrent la chromatine en fragments d'environ 200 pb, ce qui reflète une structure répétitive régulière, soient les nucléosomes. Par contre, ces fragments sont plus courts et plus hétérogènes en terme de longueur dans les régions actives pour la transcription. Ces régions sont donc nommées sites hypersensibles. En général, ces sites sont situés dans les environs des gènes transcrits et ils correspondent à des sites de liaison de différentes protéines. De plus, l'ADN de la chromatine active pour la transcription tend à être moins méthylée. Les cytosines des îlots CpG situés en 5' des gènes sont généralement moins méthylés dans les tissus exprimant ces gènes. Donc, toutes ces observations suggèrent que la chromatine active est préparée pour la transcription par l'enlèvement de structures agissant potentiellement comme barrières.

En général, l'initiation de la transcription chez les eucaryotes est toujours dépendante de l'action d'une ou de plusieurs protéines activatrices. La plupart des

gènes sont donc normalement inactifs et la cellule n'a qu'à synthétiser le groupe précis de protéines activatrices nécessaires à l'activation de la transcription des quelques gènes requis pour cette cellule. Les cellules eucaryotes ont trois ARN polymérases (I, II et III) étant spécifiques à différentes classes d'ARN. Les ARN messagers sont généralement transcrits par l'ARN polymérase II. Plusieurs importantes séquences régulatrices sont habituellement retrouvées dans ces promoteurs pour les eucaryotes plus évolués. Le premier de ces éléments régulateurs est la boîte TATA (séquence consensus TATAAAA). Cette dernière est habituellement située de 25 à 30 pb en amont du site d'initiation de transcription. Elle semble être le site de liaison du facteur de transcription appelé TFIID, requis pour la liaison de l'ARN polymérase. Même si les boîtes TATA sont relativement communes, il existe plusieurs gènes pouvant être exprimés sans boîtes TATA. Une variété d'autres séquences impliquées dans la régulation d'un gène donné sont souvent retrouvées à proximité du site d'initiation de transcription (moins de 400-500 pb). Deux exemples communs à plusieurs gènes sont les boîtes GC (séquence consensus GGGCGG) et CAAT (séquence consensus GCCAAT). Il existe également d'autres séquences régulatrices ayant des structures plus complexes, appelées *enhancers*. Leur localisation ainsi que leur orientation relative au site d'initiation de transcription ne semble pas être importantes; ces séquences exercent leurs effets régulateurs même lorsque déplacées expérimentalement, et elles peuvent être situées naturellement à des milliers de paires de bases du gène qu'elles régulent.

Chacune de ces séquences est reconnues et liées spécifiquement par une ou plusieurs protéines régulatrices appelées facteurs de transcription. Leur régulation implique des interactions protéine-protéine entre différentes protéines liées à différentes séquences d'ADN et/ou entre les protéines et l'ARN polymérase. Étant donné la distance parfois très grande entre les sites d'ADN, les contacts protéine-protéine nécessitent souvent le repliement de l'ADN (*DNA looping*).

Parmi ces protéines, les facteurs de transcription TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE et TFIIIF sont requis pour la liaison à la boîte TATA et pour la formation du complexe permettant l'initiation de la transcription. Quantité d'autres protéines activatrices existent possédant habituellement un domaine de liaison à l'ADN ainsi qu'un ou plusieurs autres domaines permettant l'activation ou des interactions avec d'autres protéines régulatrices. Sp1, CTF1, C/EBP et GAL4 ne sont que quelques-uns de ces facteurs pouvant se lier aux différentes séquences régulatrices.

Donc en résumé, la complexité de ces interactions, le nombre de protéines impliquées ainsi que le rôle central de ces processus régulateurs dans la vie de chaque eucaryotes assurent que ce domaine d'études continuera d'être vigoureusement scruté.

#### **4.2 Régulation de l'activité promotrice de gènes codant pour des enzymes stéroïdiennes**

L'ACTH est le facteur hormonal étant le plus impliqué dans la biosynthèse de la plupart des enzymes P450 stéroïdogéniques. Il exerce des effets à court et à long terme. Son action à court terme consiste à provoquer une entrée massive de cholestérol à la

mitochondrie en quelques minutes, résultant en une synthèse rapide de stéroïdes. Quant à son action à long terme, elle consiste en l'augmentation de la synthèse des enzymes stéroïdogéniques après quelques heures, provoquant une synthèse soutenue de stéroïdes.

Au niveau de la surrénale, plusieurs études antérieures ont été effectuées visant à étudier la régulation de l'expression des différents cytochromes stéroïdiens. Comme il a été mentionné précédemment, cinq sortes de cytochromes P450 permettent la conversion du cholestérol en différents stéroïdes. Certains stéroïdes seront produits à la surrénale (progestérone, pregnénolone, DHEA, androstènedione, etc.) alors que d'autres seront produits en périphérie (androgènes et oestrogènes). Les cinq cytochromes exprimés à la surrénale sont le P450<sub>scc</sub>, le P450<sub>c21</sub>, le P450<sub>c17</sub>, le P450<sub>c11</sub> et le P450<sub>aldo</sub> (la régulation de l'expression de ces deux derniers sera traitée au point 4.3).

La régulation de l'expression d'un gène est d'abord contrôlée par la liaison de différentes protéines à des éléments situés généralement en 5' de l'exon 1. Il a été démontré que tous les cytochromes P450 stéroïdogéniques possédaient au moins un site de liaison à la protéine Ad4BP (Ad4 binding protein) (Morohashi *et al.*, 1993). Cette protéine semble être très importante non seulement dans l'expression des gènes stéroïdogéniques, mais aussi dans le développement et la différenciation des structures surrénaliennes. Elle possède un domaine de liaison à l'ADN en forme de doigts de zinc (Honda *et al.*, 1993), une structure commune à plusieurs récepteurs d'hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes. Des études de comparaison ont permis de démontrer une forte homologie d'Ad4BP avec la protéine FTZ-F1 de la drosophile (Lavorgna *et al.*, 1991), qui contrôle le gène *fushi tarazu* pendant l'embryogenèse, et avec son

homologue chez le mammifère, ELP (Tsukiyama *et al*, 1992). Le promoteur du gène *CYP11A1* de bovin contient trois éléments, centrés à -40, -815 et -830 pb par rapport au site d'initiation de transcription, qui sont des variations du motif 5'-AGGTCA-3' liant la protéine Ad4BP. Les promoteurs du gène *CYP11A1* de l'humain et du rat en contiennent respectivement un (-350 pb) et deux (-45 et -75 pb) (Morohashi *et al*, 1992). Quant aux promoteurs des gènes *CYP21* et *CYP17* de bovin, ils contiennent chacun deux séquences liant la protéine Ad4BP (*CYP21*: -160 et -750 pb et *CYP17*: -40 et -70 pb) (Morohashi *et al*, 1992).

L'expression des gènes *CYP11A1*, *CYP21* et *CYP17* est en majeure partie régulée par l'hormone peptidique ACTH. Cette dernière produit son effet sur la cellule par l'utilisation de l'AMPc comme second messager. L'analyse de la région promotrice de ces trois gènes a mené à l'identification d'éléments répondant à l'AMPc. Par contre, la séquence nucléotidique de ces éléments, nommés *cAMP responding sequences* (CRSs), ne correspond pas à celle des éléments répondant à l'AMPc (CRE) classique. De plus, les différents facteurs interagissant avec ces séquences ne sont pas les mêmes que ceux liant l'élément CRE (Ahlgren *et al*, 1999).

L'analyse de l'élément CRS (-115 pb) du promoteur du gène *CYP21A2* humain a permis de montrer qu'il contenait une boîte GC, soit une séquence connue liant le facteur de transcription ubiquitaire Sp1. De plus, différentes expériences ont montré que la protéine d'origine surrénalienne *adrenal specific protein* (ASP) liait la partie 5' de l'élément CRS (Waterman *et al*, 1992).

Ensuite, l'analyse de l'élément CRS (-105 pb) du promoteur du gène *CYP11A1* de bovin a aussi permis d'identifier une boîte GC liant Sp1 et une autre partie de la séquence liant ASP (Waterman *et al*, 1992). Une autre boîte GC aux environs de -70 pb a aussi été identifiée liant encore une fois Sp1 (Ahlgren *et al*, 1999). La proximité de cette séquence avec celle liant Ad4BP (-40 bp) a mené à une étude très intéressante. Liu et Simpson (1997) ont montré qu'il y avait coopération entre les protéines Sp1 et Ad4BP dans la transactivation du gène *CYP11A1* de bovin. De plus, ils ont pu démontrer qu'il y avait association entre ces deux protéines *in vivo*. Ces résultats démontrent donc que l'activité basale et stimulée du promoteur du gène *CYP11A1* de bovin dépendait de l'action combinée d'au moins deux facteurs de transcription, Sp1 et Ad4BP.

Finalement, l'analyse du promoteur du gène *CYP17* de bovin a permis d'identifier deux éléments CRS, nommés CRS I (-235 pb) et CRS II (-60 pb) (Waterman *et al*, 1992). L'élément CRS I est la cible d'une signalisation via la voie des protéine kinase A (PKA). La protéine PbxI augmente la transcription du gène via cet élément, mais la nature d'autres protéines se liant à cet élément demeure inconnue (Lund *et al*, 1997). De plus, il n'est pas connu comment la PKA régule l'activité de PbxI et de ses partenaires.

Plus près du site d'initiation de transcription, les protéines Ad4BP ainsi que *chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor* (COUP-TF) ont des sites de liaison se chevauchant à l'intérieur de l'élément CRS II. Il a été observé que la protéine Ad4BP stimulait alors que COUP-TF inhibait la transcription du gène *CYP17* de bovin.

Ces résultats suggèrent donc que le rapport entre la quantité d'activateur Ad4BP et de répresseur COUP-TF, régulé en partie par la voie de l'AMPc, pourrait influencer la transcription dépendante de l'élément CRS II (Lund *et al*, 1992).

### **4.3 Régulation de l'activité promotrice du gène *CYP11B2***

Le cytochrome P450aldo, exprimé à partir du gène *CYP11B2*, a été le dernier P450 stéroïdogénique à être purifié et caractérisé. Plusieurs travaux ont permis, à la fin des années 1980, d'isoler ce cytochrome, similaire à 90% au cytochrome P450c11 dans sa séquence d'acides aminés. Les preuves de l'implication du P450aldo dans l'étape finale de synthèse de l'aldostérone ont été publiées pour la première fois en 1989 chez l'humain (Mornet *et al*, 1989), en 1990 chez le rat (Imai *et al*, 1990) et en 1991 chez la souris (Domalik *et al*, 1991).

Comme il a été mentionné précédemment, la régulation de l'expression d'un gène est contrôlée en grande partie par la liaison de différentes protéines à des éléments situés généralement en 5' de l'exon 1. Six de ces éléments sont très conservés dans la région promotrice des gènes *CYP11B1* et *CYP11B2*, soient Ad1, Ad2, Ad3, Ad4, Ad5 et Ad6 (Kirita *et al*, 1990).

Il a été démontré que le site Ad1 (TGACGTGA), s'apparentant à 90% au site consensus CRE, était impliqué dans l'expression basale et stimulée à l'AMPc des gènes *CYP11B* chez le bovin (Hashimoto *et al*, 1992), la souris (Rice *et al*, 1989) et l'humain (Clyne *et al*, 1997). Différents facteurs liant la séquence Ad1 ont été purifiés, tels que la protéine liant CRE (CREB) et les facteurs activant la transcription (ATF). Leurs

structures ont été déterminées et leur implication comme composants de la voie de signalisation AMPc/PKA a été caractérisée (Berkowitz et Gilman, 1990).

Quant au site Ad2, des études de délétion ont montré que sa présence était également nécessaire pour la transcription du gène *CYP11B* chez le bovin (Morohashi et Omura, 1990). Par contre, sa séquence nucléotidique ne semble correspondre à celle d'aucun autre élément *cis* connu jusqu'à maintenant. De plus, deux facteurs provenant d'un extrait nucléaire de corticosurrénale de bovin se liaient à la séquence Ad2 (Morohashi et Omura, 1990), mais la nature de ces facteurs reste toujours à déterminer.

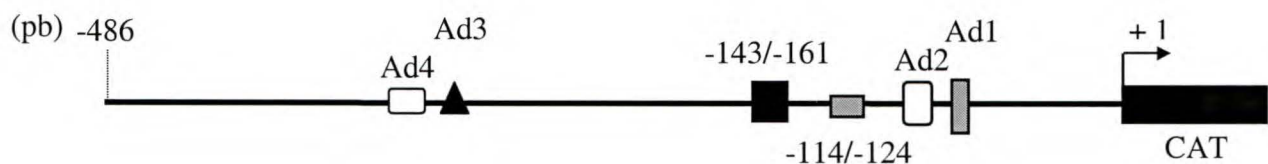
La nécessité de la présence des éléments Ad3 et Ad4 pour une induction maximale par l'AMPc du gène *CYP11B* a également été démontrée chez le bovin. Ces deux éléments sont très bien conservés chez les différentes espèces et leur coexistence semble nécessaire pour leur fonction d'induction (Honda *et al*, 1990). De plus, des analyses d'empreinte à la désoxyribonucléase I (DNase I) ont démontré la présence de deux autres éléments *cis*, nommés Ad5 et Ad6, ne semblant pas contribuer à l'induction du gène *CYP11B* par l'AMPc.

D'autres études effectuées depuis quelques années ont été menées en utilisant comme système les cellules NCI-H295. Cette lignée cellulaire provient d'un carcinome surrénalien humain (Gazdar *et al*, 1990) et a comme caractéristique d'augmenter la production d'aldostérone et l'expression du gène *CYP11B2* en réponse à l'AI et au potassium (Bird *et al*, 1993). La protéine Ad4BP, provenant d'un extrait des cellules NCI-H295, a démontré une liaison à la séquence de l'élément Ad5 du gène *CYP11B2*



de l'humain (Clyne *et al*, 1997). Donc en plus de l'élément Ad1, ce site Ad5 semble être requis pour l'expression basale et stimulée de ce gène chez l'humain.

D'autres études ont également été effectuées avec le gène *CYP11B2* de hamster. La présence d'un septième élément *cis* permettant une induction maximale par l'AII et le potassium dans les cellules NCI-H295 a été démontrée (LeHoux et Lefebvre, 1998) (Figure 5). En effet, lorsque les cellules NCI-H295 ont été transfectées avec différents promoteurs tronqués, l'expression maximale du gène a été obtenue avec la construction contenant les éléments Ad1, Ad2, Ad5 et ce nouvel élément situé à -143/-161 pb (LeHoux et Lefebvre, 1998). L'inclusion de l'élément suivant, Ad3, a provoqué une baisse substantielle de l'activité promotrice, suggérant donc la présence d'éléments inhibiteurs dans cette région.



**FIGURE 5:** Représentation schématique du promoteur du gène *CYP11B2* de hamster. La position des différents éléments *cis* impliqués dans la transcription du gène *CYP11B2* de hamster est indiquée.

#### **4.4 Objectifs de la recherche**

Le premier objectif du projet de recherche consistait à étudier le rôle de régions du promoteur du gène *CYP11B2* protégées à la DNase I par un extrait nucléaire de surrénales de hamster (Coulombe *et al.*, 1997), et ce, en créant des mutants dans ces régions. Les nucléotides des éléments Ad1, Ad2 et de la partie 3' de l'élément Ad5 (-114/-124 pb) ont été mutés respectivement dans la construction de -486 pb, et l'activité transcriptionnelle de ces mutants a été évaluée dans les cellules NCI-H295 en présence et en absence d'AII, de potassium, de dBt cAMP et de forskoline.

Le deuxième objectif consistait à étudier plus finement la grande région inhibitrice qui précède l'élément Ad3 en construisant des plasmides de délétion (-225, -261 et -293 pb) afin de comparer leur activité transcriptionnelle dans les cellules NCI-H295 avec ou sans addition d'AII, de dBt cAMP ou de potassium.

## **RÉSULTATS**

### **1. CHAPITRE 1**

#### **1.1 ARTICLE: CHARACTERISATION OF THE ENHANCING REGULATORY REGION OF THE HAMSTER *CYP11B2* GENE**

## **Characterisation of the Enhancing Regulatory Region of the Hamster *CYP11B2* gene**

Philippe Sarazin, Andrée Lefebvre and Jean-Guy LeHoux

Département de Biochimie, Faculté de Médecine, Université de Sherbrooke,  
Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4. Tel: (819) 564-5282; Fax: (819) 820-6852;  
E-mail: jlehou01@courrier.usherb.ca

(Requests for reprints should be addressed to JG LeHoux)

Running title: Hamster *CYP11B2* gene regulation

## ABSTRACT

We have studied the effects of angiotensin II (AII), KCl, forskolin and dBt cAMP on a deletion plasmid harboring the first -486 bp (wild type) of the 5'-flanking region of the hamster *CYP11B2* gene in the NCI-H295 cell line. A time study of the action of AII showed a bi-phasic effect, with maximal increases in transcriptional activity after 16 h and 72 h of incubation. In the presence of KCl, the promoter activity was already increased at 6 h, whereas in the presence of dBt cAMP or forskolin, maximal increase was observed after 24 h of incubation. We have reported that the basal hamster *CYP11B2* promoter activity augmented progressively by gradually increasing the length of deletion plasmids up to -167 base pair (bp) of the 5'-flanking region of the gene. We also found that mutation in the -143/-161 *cis*-element partially reduced the stimulatory effects of AII, KCl and forskolin on promoter activity (LeHoux *et al.* 1998). In the current study, three other DNase I protected elements located within the first -167 bp of the promoter, named respectively Ad1, Ad2 and the -114/-124 region, were mutated in order to determine their importance in the positive regulation of the hamster *CYP11B2* promoter activity. Double mutants were also engineered. Cells were challenged by different regulators for 24 or 72 h. The basal activity of the Ad1 mutant (mAd1) was completely abolished and treatments with AII, KCl, dBt cAMP and forskolin did not restore the activity. The basal promoter activity of the Ad2 mutant (mAd2) was attenuated by 50% and 80% after 24 h and 72 h of incubation respectively. Although mAd2 basal promoter activity was decreased, AII stimulated its activity similar to wild type levels. In contrast, stimulations by KCl, dBt cAMP and forskolin on mAd2 activity were all significantly attenuated. The basal promoter activity of the -114/-124 mutant was attenuated by 68% and 53% after 24 h and 72 h of incubation respectively. Although it was decreased, the activity of this mutant was still stimulated by AII, KCl, dBt cAMP and forskolin to activity levels similar to the wild type promoter. The double mutation in Ad2 and -114/-124 resulted in an additional 35% decrease in basal activity compared to mAd2 after 72 h of incubation. Stimulations by AII, KCl and dBt cAMP on the double mutant were not attenuated compared to those on mAd2. Another double mutation in Ad2 and -143/-161 resulted in a significant decrease in basal promoter activity of 33% compared to mAd2 activity after 72 h of

incubation; the stimulatory effects of AII, KCl and dBt cAMP were significantly attenuated for the double mutant compared to mAd2. Taken together, these results show that Ad1 is mandatory for the hamster *CYP11B2* promoter activity. The Ad2 *cis*-element and the -114/-124 region are both needed for full basal promoter activity and appear to act in synergy. The presence of Ad2 is required for maximal induction by either dBt cAMP or calcium-signalling pathways.

Furthermore, using the calcium channels antagonist nifedipine, we have studied the participation of calcium channels in the regulation of *CYP11B2* transcriptional activity in NCI-H295 cells. We found that nifedipine significantly blocked the enhancing effects of AII, dBt cAMP and forskolin by 49%, 41% and 66% respectively on the transcriptional activity of the wild type -486 bp deletion plasmid, whereas it completely blocked the stimulatory effects of KCl. These results thus show the involvement of calcium channels in the regulation of *CYP11B2* gene transcription by KCl and their partial involvement in the mechanisms of regulation of this gene by AII, dBt cAMP and forskolin.

## INTRODUCTION

Aldosterone biosynthesis in the *zona glomerulosa* (ZG) of the adrenal cortex requires the sequential action of several enzymes. Depending on species, aldosterone synthesis is controlled at the final step either by the *CYP11B1* gene product cytochrome P450 11 $\beta$ -hydroxylase (P450C11) or by the *CYP11B2* gene product cytochrome P450 aldosterone synthase (P450aldo) (1). In bovine (2), porcine (3) and ovine (4), P450C11, which is involved in the final step of glucocorticoids formation, is also responsible for 11 $\beta$ -hydroxylation and 18-oxydoreduction of deoxycorticosterone (DOC) to yield aldosterone. In contrast, in human (5), mouse (6), rat (7-8) and hamster (9-10), P450C11 is not involved in the formation of aldosterone in the ZG and it is P450aldo that is responsible for the transformation of DOC to aldosterone.

Many regulators, including the renin-angiotensin system, potassium ions and adrenocorticotropin ACTH (1) positively control mineralocorticoid formation. We have reported that sodium restriction increases the expression of the hamster *CYP11B2* gene (11). The effect of sodium restriction is mediated through AII in rat adrenal since its action is inhibited by captopril, an inhibitor of angiotensin converting enzyme (12). *In vivo*, a high potassium intake increases the rat ZG content in P450aldo mRNA and protein. *In vitro*, in NCI-H295 cells, potassium ions regulate aldosterone formation via the opening of calcium channels, an action that is completely inhibited by nifedipine (13-14). The rapid increase in plasma aldosterone level following ACTH administration *in vivo* (15-16) probably reflects cholesterol transfer to mitochondrial P450 side chain cleavage enzyme and does not affect the expression of P450aldo.

We have isolated the *CYP11B2* gene encoding P450aldo from a hamster genomic library, and we have studied the transcriptional activity of its 5'-flanking region in Y1 (17-18) and NCI-H295 cells (14). In transfected NCI-H295 cells, the hamster *CYP11B2* promoter coupled to the reporter chloramphenicol acetyl transferase (CAT) gene was stimulated by AII, potassium and forskolin (14). Also, Clyne *et al.* (19) reported an increased activity of the human *CYP11B2* promoter upon stimulation by forskolin, KCl and AII in NCI-H295 cells.

Our studies with different deletion constructions of the *CYP11B2* 5'-flanking region showed that basal and stimulated promoter activity progressively increased with the length of the upstream region up to -167 base pair (bp). A mutation in the -143/-161 *cis*-element partially inhibited basal and stimulated activity of the reporter gene (14), indicating the importance of this *cis*-element. The partial inhibition also indicates that other elements of the promoter are required for maximal activity of the gene. In the present study, we have mutated three different areas of the 5'-flanking region that had been found protected by a hamster adrenal nuclear extract using footprinting analysis (17-18); these selected elements for mutation correspond to the putative Ad1 and Ad2 (20-21) and the -114/-124 protected area.



## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Deletion plasmids

The pCAT<sup>R</sup> basic vector (Promega, Madison, WI) was modified by removing AP-1 and AP-1 like *cis*-elements and by adding two polyadenylation signal sequences upstream the multicloning site as we previously described (18). This modified vector was used to construct *CYP11B2* gene deletion plasmids.

### Mutations of Ad1, Ad2 and -114/-124 *cis*-elements

To mutate Ad1, the sequence 5'-TGACGTGA-3' was changed to 5'-TTGGTACC-3' which comprised a *Kpn* I site (underlined). To do so, polymerase chain reactions (PCR) were performed on the -486 construction using two sets of primers; first: 5'-GATCGCATGCAGCTTTCCTCCTTTTTTTTTTTT-3' (sense) with a *Sph* I site and 5'-CATGGTACCAATGGAAGAAGCTGTCCCTG-3' (antisense) with a *Kpn* I site; second: 5'-ATTGGTACCTTAGTCCAACAGTACAGTAC-3' (sense) with a *Kpn* I site and 5'-CATCTGCAGCCCTCCCTACTCTGTCTG-3' (antisense) with a *Pst* I site. The fragments were then digested with the corresponding enzymes and ligated with the pCAT vector digested with *Sph* I and *Pst* I. The same sense primers with a *Sph* I site and antisense with a *Pst* I site were used to generate the mutants Ad2 and -114/-124. To mutate Ad2, the sequence 5'-CCAGGGACAGC-3' was changed to 5'-CTGGTACCCAT-3'; the antisense primer for the first PCR was 5'-ATGGGTACCAGACTTGCCCGGGAGATCC-3', and the sense primer for the second PCR was 5'-TCTGGTACCCATTTCTTCCATGACGTGATTAG-3'. To mutate the -114/-124 *cis*-element, the sequence 5'-GATTAGAGCCT-3' was changed to 5'-CTCTGGTACCA-3'; the antisense primer for the first PCR was 5'-CATGGTACCAGAGATAGCTGGGGCTCACCTG-3', and the sense primer for the second PCR was 5'-CTCTGGTACCAGGATCTCCCGGGCAAGT-3'. The -143/-161 *cis*-element was mutated as previously described (14). Double mutants were made by inserting the *Sph* I/Ava I fragments of -114/-124 or -143/-161 mutants into the Ad2 mutant.

## Cell Culture

NCI-H295 cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)/Ham F12 (1:1) supplemented with 1% ITS<sup>TM</sup> Premix (Becton Dickinson Labware, Bedford, MA), 2% UltroSer SF (Bio Septra S.A., Villeneuve la Garenne, France), 200 µg/ml Streptomycin, and 200 U/ml Penicillin G. Cells were grown at 37°C under 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>.

## Transient Transfections and CAT Assays

NCI-H295 cells ( $3.5 \times 10^5$ ) were seeded into six-well plates until 80-90% confluent. The cells were transiently transfected for 6 h with plasmid constructions using Lipofectamine<sup>TM</sup>, according to the manufacturer's protocol (Gibco BRL, Burlington Ontario, Canada). After transfection, cells were incubated with medium containing 2% UltroSer SF for 16 h to allow recovery and expression of foreign DNA. Cells were then incubated with low serum medium (DMEM/F12 containing 0.1% UltroSer SF) for a further 24 h. Media were changed and different regulators were then added. This time point was considered as time zero. The time studies experiments were performed in the presence of AII ( $10^{-9}$  M and  $10^{-7}$  M), forskolin (10 µM), KCl (16 mM) or dibutyryl cyclic adenosine monophosphate (dBt cAMP) (1 mM). Media were changed with fresh media containing the different regulators every 24 h. For the other series of experiments, incubation times were 72 h for AII and 24 h for forskolin, KCl and dBt cAMP. Cell lysates were prepared by the freeze-thaw method (22) and CAT assays were performed using [<sup>14</sup>C]chloramphenicol (22); [<sup>14</sup>C]acetylated forms were separated by silica gel-coated thin layer chromatography and radioactivity was quantitated using an optical imager (Storm860<sup>TM</sup>, Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). CAT activity was calculated as the percentage of chloramphenicol converted to acetylated forms as previously described (14). All experiments were done using three different plasmid preparations, each performed in triplicate. Statistical significance was determined using Anova or Student's *t*-Test, and a value of  $P < 0.05$  was considered significant.

**Steroid quantification**

The level of aldosterone in the incubation media was measured by the Coat-A-Count radioimmunoassay procedure (Diagnostic Products, Los Angeles, CA).

## RESULTS

### Effects of regulators on CAT activity in NCI-H295 cells

In a first series of experiments, we investigated the effects of AII on CAT activity in NCI-H295 cells transfected with the wild type -486 bp construct, a time study experiment. As shown in Fig. 1A, there were no apparent changes in CAT activity within the first 6 h of AII stimulation as compared to a control. However, a bi-phasic stimulatory effect occurred afterward, with a first peak of activity after 16 h and a second one after 72 h of incubation. The concentrations  $10^{-9}$  M or  $10^{-7}$  M AII gave identical stimulations after 16 h but the amplitude of the increase was higher after 72 h of incubation at a concentration of  $10^{-7}$  M. Aldosterone could be detected only after 6 h of incubation with a value of  $0.040 \pm 0.002$  nM. As shown in Fig. 1B, the aldosterone output increased dramatically to reach a first peak at 16 h at  $10^{-7}$  M of AII with a 56-fold increase over the control. The second peak occurred after 72 h of treatment with a 74-fold increase.

Forskolin and dBt cAMP did not affect CAT activity within the first 6 h of incubation; however, increased activity was observed after 16 h. Maximal activities were reached after 24 h of incubation with 2- and 4-fold increase in the presence of forskolin and dBt cAMP respectively, and decreased thereafter. (Fig. 1C). In contrast, the hamster *CYP11B2* promoter activity was rapidly stimulated by KCl with a 3-fold increase after 6 h of incubation and a maximal 4-fold increase after 24 h of incubation, and a decrease by half after 48 h. Fig. 1D shows that in this series of experiments, media aldosterone levels were increased after 24 h of incubation in the presence of dBt cAMP, forskolin and KCl by factors of  $3.1 \pm 0.2$  fold,  $3.3 \pm 0.2$  fold and  $2.2 \pm 0.1$  fold, respectively.

### Mutation in Ad1 cis-element of the hamster *CYP11B2* gene

As reported earlier (14), progressive increases in basal and in stimulated CAT activities occurred when NCI-H295 cells were transfected with *CYP11B2* deletion plasmids containing up to -167 bp of the 5'-flanking region of the gene. In this part of the promoter, in addition to the previously described -143/-161 enhancing cis-element, three other regions were found protected

by footprinting analysis (results not shown), namely the putative Ad1 and Ad2 *cis*-element and the -114/-124 sequence (see Fig. 2). The putative Ad1 *cis*-element was thus mutated in the -486 construct to study its implication in the *CYP11B2* gene regulation. Fig. 3A and 3B show that, compared to wild-type, the mutation of the Ad1 *cis*-element significantly decreased basal CAT activity by 90% and 85% after 24 h and 72 h of incubation, values that were identical to those found for a control plasmid containing no promoter (results not shown). This mutation also completely abolished the stimulating effects of AII (Fig. 3B), KCl, dBt cAMP and forskolin (Fig. 3A) on CAT activity. These results thus show that the Ad1 *cis*-element is mandatory for basal and stimulated *CYP11B2* transcriptional activity in NCI-H295 cells.

#### **Mutation in Ad2 *cis*-element of the hamster *CYP11B2* gene**

The putative Ad2 *cis*-element region was also mutated in the -486 construct. Compared to wild-type, the basal CAT activity of mAd2 was attenuated by 50% ( $p < 0.001$ ) (Fig. 3C) and 82% ( $p < 0.0005$ ) (Fig. 3B) after 24 h and 72 h of incubation, respectively. The stimulatory effects of AII (Fig. 3B), KCl, dBt cAMP and forskolin (Fig. 3C) on the wild type -486 construct were 2.6 fold ( $p = 0.0001$ ), 5.8 fold ( $p < 0.0001$ ), 3.3 fold ( $p = 0.003$ ) and 3.0 fold ( $p = 0.001$ ) respectively; the stimulatory effects of the last three regulators on mAd2 were all significantly attenuated [2.6 fold ( $p = 0.006$ ) for KCl, 1.6 fold ( $p = 0.04$ ) for dBt cAMP and 1.3 fold (non-significant (NS)) for forskolin]. In contrast, the stimulation by AII on mAd2 (2.6 fold ( $p = 0.001$ )) was identical to the one observed for the wild-type. These results thus confirm the importance of the Ad2 *cis*-element in participating to basal and stimulated *CYP11B2* transcriptional activity in NCI-H295 cells.

#### **Mutation in -114/-124 *cis*-element of the hamster *CYP11B2* gene**

The results of the next series of experiments show that mutation of the putative -114/-124 *cis*-element resulted in a decrease in *CYP11B2* promoter activity. Fig. 3B and 3D shows that the basal CAT activity of the mutant was significantly lowered by 68% ( $p = 0.008$ ) and 53% ( $p = 0.0001$ ) compared to the wild type -486 construction, after 24 h and 72 h of incubation respectively. This mutation, however, did not significantly affect the stimulations by

AII [2.5 fold ( $p = 0.0001$ ) for the wild type vs 2.6 fold ( $p = 0.0003$ ) for the mutant], KCl [5.5 fold ( $p = 0.0003$ ) for the wild-type vs 5.4 fold ( $p = 0.0001$ ) for the mutant], dBt cAMP [4.3 fold ( $p = 0.008$ ) for the wild-type vs 3.5 fold ( $p = 0.01$ ) for the mutant] and forskolin [2.7 fold ( $p = 0.004$ ) for the wild type vs 2.4 fold ( $p = 0.02$ ) for the mutant].

### **Double mutations in Ad2/-114/-124 and in Ad2/-143/-161 of the hamster *CYP11B2* gene**

To determine a possible relationship between the different *cis*-elements studied, we have performed two different double mutations. A double mutation in Ad2 and -114/-124 resulted in a significant (35%,  $p = 0.009$ ) decrease in basal activity compared to mAd2 after 72 h of incubation (Fig. 4A); the basal activity was still 47% ( $p = 0.04$ ) higher than that of the plasmid containing no *CYP11B2* promoter. AII enhanced the double mutant activity similarly to mAd2 [2.3 fold ( $p = 0.003$ ) vs 2.0 fold ( $p = 0.008$ ) respectively]. However, the stimulations by KCl and dBt cAMP on the double mutant were higher than those of mAd2 [3.6 fold ( $p = 0.0003$ ) and 3.1 fold ( $p = 0.001$ ) vs 2.0 fold ( $p = 0.03$ ) and 1.9 fold ( $p = 0.07$ ) respectively] (Fig. 4B).

When compared to the activity of mAd2, another double mutation in Ad2 and -143/-161 resulted in a significant (33%,  $p = 0.008$ ) decrease in basal activity of the double mutant after 72 h of incubation (Fig. 4C). The basal activity was still 29% ( $p = 0.002$ ) higher than that of the plasmid containing no *CYP11B2* promoter. Stimulations by AII, dBt cAMP and KCl on the double mutant were all lower than those of mAd2 [1.3 fold ( $p = 0.02$ ), 1.5 fold (NS) and 1.6 fold (NS) vs 1.9 fold ( $p = 0.01$ ), 3.2 fold ( $p = 0.005$ ) and 3.7 fold ( $p = 0.01$ ) respectively] (Fig. 4D).

### **Effects of nifedipine on the hamster *CYP11B2* gene transcriptional activity**

In order to study the involvement of calcium channels on transcriptional activity of the *CYP11B2* promoter, the calcium channels antagonist nifedipine was incubated in the presence of either AII, dBt cAMP, forskolin or KCl. For this series of experiments, deletion plasmid harboring the first -486 bp of the 5'-flanking region of the hamster *CYP11B2* gene was used in the NCI-H295. Fig. 5 shows that nifedipine partially blocked the enhancing effects of AII, dBt cAMP and forskolin on CAT activity by 49% (Fig. 5A), 41% (Fig. 5B) and 66% (Fig. 5C)

respectively. This calcium channels inhibitor completely blocked the stimulatory effects of KCl (Fig. 5D), confirming our previous report (14).

Table 1 shows that nifedipine blocked 61% of the enhancing effects of AII on aldosterone output in NCI-H295 cells. Nifedipine completely blocked the stimulatory effect of KCl but showed no blocking effect when co-incubated with either forskolin or dBt cAMP. Nifedipine alone had no effect on the basal level of aldosterone (results not shown).

These results thus show the partial involvement of calcium channels in the mechanisms of regulation of the hamster *CYP11B2* gene and aldosterone biosynthesis in NCI-H295 cells by AII, dBt cAMP and forskolin and their crucial role in the regulation of *CYP11B2* gene transcription by KCl.

## DISCUSSION

We previously found three different areas of the 5'-flanking region of the hamster *CYP11B2* gene protected from DNase by hamster adrenal nuclear extract (18). In the present study, using the CAT reporter gene, we show that these *cis*-elements are necessary for basal expression and for maximal stimulation by AII, KCl, forskolin and dBt cAMP in NCI-H295 cells.

In a time study experiment, we have determined that AII stimulates aldosterone output and hamster *CYP11B2* transcriptional activity in a bi-phasic manner, with maxima at 16 h and 72 h. This bi-phasic phenomenon might be due to the fact that AII action is mediated by AII receptors type 1 whose expression is under the control of AII in NCI-H295 cells. Indeed, Bird *et al.* (23) showed that AII promoted an initial decline in receptor binding reaching a minimum of 40% of control by 12 hours and then returned to control levels by 24 h. This bi-phasic effect of AII on its binding to AT<sub>1</sub> receptors might well explain the bi-phasic effect observed on aldosterone output and hamster *CYP11B2* transcriptional activity. The results of the time study experiments also show that the aldosterone production in response to KCl does not correlate well with its effect on promoter activity, as it is much more potent in inducing promoter activity than aldosterone synthesis. Furthermore, the opposite result is observed with the forskolin treatment, as it is more potent in inducing aldosterone synthesis than promoter activity. A possible explanation for this dichotomy is that the cAMP pathway activated by the forskolin treatment is also stimulating other steroidogenic P450 genes located upstream of the P450<sub>aldo</sub> gene in the aldosterone biosynthesis pathway (P450<sub>scc</sub>, P450<sub>c21</sub> and P450<sub>c11</sub> genes). This could result in increased substrate readily available for the catalysis of the reaction leading to aldosterone synthesis. However, this is unlikely the case with the calcium pathway (stimulated by the KCl treatment), which seems to be specific for the *CYP11B2* gene activation. And by observing the overall results, it appears that the calcium pathway is more potent than the cAMP pathway in inducing promoter activity of the first 486 pb of the 5'-flanking region. Further studies need to



be done to identify the different elements and transcription factors associated with the specificity of the calcium pathway.

In a previous report, we have observed that basal transcriptional activity of the hamster *CYP11B2* gene augmented progressively by increasing the length of its 5'-flanking region (14). The first -167 bp were sufficient to obtain maximal transcriptional activity. Footprinting analysis revealed a protected region between -143/-161 bp. Mutation of this region resulted in a 50% decrease in basal promoter activity and in partial inhibition of the activation by AII and KCl; stimulation by forskolin was abolished (14). Since mutation in the -143/-161 *cis*-element only partially inhibited the *CYP11B2* promoter activity, mutations in other putative *cis*-elements were done in order to determine their relative importance in the hamster *CYP11B2* gene transcriptional activity. Indeed, we found that other areas of the hamster *CYP11B2* promoter are important for promoter activity. Mutation in the putative hamster Ad1 *cis*-element diminished basal CAT activity to the same level as that of the control plasmid and also completely blocked any stimulations by AII, KCl, dBt cAMP and forskolin. These results are in agreement with those of Mouw *et al.* (24), which reported that Ad1 mutant in the mouse *cyp11b2* gene was devoided of promoter activity. In this respect, the Ad1 *cis*-element of the hamster *CYP11B2* gene is also similar to that of the human *CYP11B2* (19) and bovine *CYP11B1* genes (21); mutation of this element in the two latter genes decreased not only the induction rate by cAMP but also the non-induced level of transcriptional activity.

The second putative *cis*-element we mutated was in the conserved region named Ad2 (21). The basal activity of this mutant was lowered by 50% and 80% after 24 h and 72 h of incubation, respectively. Moreover, this mutation attenuated the stimulatory action of KCl, dBt cAMP and forskolin but not of AII. In agreement with our results, the deletion of Ad2 and Ad1 *cis*-elements in the bovine *CYP11B1* gene lowered the basal activity by 40% and 70%, respectively (25).

The third mutation was done in the region -114/-124 which is protected from DNase I by a hamster adrenal nuclear extract; this region is in the vicinity of the Ad5 sequence which is

conserved in *CYP11B* genes among different species. This mutation decreased the basal activity of the promoter without affecting the stimulatory effects of AII, KCl and dBt cAMP. In the human *CYP11B2* gene, Clyne *et al.* (19) identified a *cis*-element that is required for full basal activity and for maximal induction by either cAMP or calcium-signaling pathways; this *cis*-element, located in the Ad5 area, demonstrated binding of the orphan nuclear receptors Ad4 binding protein (Ad4BP) and chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF). Similarly, Morohashi *et al.* (26) reported that purified Ad4BP had binding activity for the bovine *CYP11B1* Ad5 site. In the human *CYP11B2* gene, the last seven nucleotides TGACCTT in the Ad5 area involved in the binding of Ad4BP, forms an Ad4-like sequence. Such a sequence is not present in the vicinity of the -114/-124 *cis*-element of the hamster, rat (27) and mouse (24, 28-29) *CYP11B2* genes. Thus, Ad4BP is unlikely to contribute to the enhancing effect of the -114/-124 region.

The two double mutations (mAd2/-114/-124 and mAd2/-143/-161) resulted in further decreases in promoter basal activity compared to mAd2, indicating additive effects of these elements of the gene. For the double mutant mAd2/-114/-124, the AII stimulation was similar to that of wild-type indicating that the observed decrease in activity was due to the decrease in basal activity. At the present time, we do not know why the KCl and dBt cAMP stimulations are greater for the double mutant mAd2/-114/-124 than for those of mAd2. In contrast, the interaction between Ad2 and -143/-161 seems to be important for basal and stimulated activity. Indeed, for the double mutant mAd2/-143/-161, stimulations by KCl, dBt cAMP and AII were considerably attenuated compared to those of mAd2, showing the importance of the hamster *CYP11B2* -143/-161 *cis*-element. In summary, these results show that Ad1 is mandatory and that Ad2, -114/-124 and -143/-161 *cis*-elements are all contributing positively to enhance the expression of the hamster *CYP11B2* gene.

We have also compared the effect of the calcium channels antagonist nifedipine on KCl, AII, dBt cAMP and forskolin treatments. While nifedipine completely blocked the effect of KCl, it only diminished the stimulatory action of AII on transcriptional activity by 50% and on aldosterone output by 60%, indicating that the action of AII is only partly mediated by nifedipine-sensitive calcium channels and that other mechanisms are involved in the induction

of the gene by AII. Indeed, in support to our results, previous studies on NCI-H295 cells have shown that binding of AII to the AII receptor resulted not only in a rapid increase in intracellular free  $\text{Ca}^{2+}$  but also to the activation of phosphoinositidase-C and to an increased production of phosphoinositols (30). This contrasts with the mode of action of KCl. KCl appears to fully depend on the opening of voltage-sensitive calcium channels given that the aldosterone output and the *CYP11B2* promoter activity were completely blocked by nifedipine. Moreover, our results showed that although nifedipine decreased the stimulatory effects of dBt cAMP and forskolin by 41% and 66% on *CYP11B2* promoter activity, their stimulatory effects on aldosterone output was not affected by the presence of this calcium channels antagonist. This discrepancy between results can be explained by the fact that even though *CYP11B2* transcription is inhibited, its mRNA level is not affected (31). Indeed, Denner *et al* showed that nifedipine did not affect the stimulation of P450aldo mRNA by dBt cAMP in NCI-H295 cells. Thus this confirms the importance of calcium in the mode of action of potassium, and differentiates its action from those of AII and cAMP.

In conclusion, we found that the 5'-flanking region of the hamster *CYP11B2* gene in transfected NCI-H295 cells possesses transcriptional activity which can be controlled by AII, KCl, forskolin and dBt cAMP. Our results suggest that this gene is regulated at least in part, through the protein kinase A signaling pathway and through calcium channels. We have shown that the *cis*-element Ad1 is essential for the expression of the hamster *CYP11B2* gene, but that the other Ad2, -114/-124 and -143/-161 *cis*-elements also participate to full basal and stimulated transcriptional activity of the gene.

**Acknowledgements**-We are grateful to Dr WE Rainey for providing NCI-H295 cells. This work was supported by a grant from the Medical Research Council of Canada (MT10983) and the Heart and Stroke Foundation of Canada.

## REFERENCES

1. LeHoux J. G., Bernard H., Ducharme L., Lefebvre A., Shapcott D., Tremblay A., and Véronneau S. (1996) *Adv. Mol. Cell Biol.* **14**, 149-201 Eds EE Bittar and GR Jefcoate. Connecticut: Jai Press Inc Greenwich.
2. Morohashi K. I., Nomaka Y., Kirita S., Hatano S., Takakusu A., Okamoto M., and Omura T. (1990) *J. Biochem.* **107**, 635-640
3. Yanagibashi K., Haniu M., Shively J. E., Shen W. H., and Hall P. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 3556-3562
4. Boon W. C., Roche P. J., Hammond V. E., Jeyaseelan K., Crawford R. J., and Coghlan J. P. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **1260**, 109-112
5. Mornet E., Dupont J., and White P. C. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 20961-20967
6. Domalik L. J., Chaplin D. D., Kirman M. S., Wu R. C., Liu W., Howard T. A., Seldin M. F., and Parker K. L. (1991) *Mol. Endocrinol.* **5**, 1853-1861
7. Imai M., Shimada H., Okada Y., Matsushima-Hibiya Y., Ogishima T., and Ishimura Y. (1990) *FEBS Lett.* **263**, 299-302
8. Nomura M., Morohashi K. I., Kirita S., Nanoka Y., Okamoto M., Nawata H., and Omura T. (1993) *J. Biochem.* **113**, 144-152
9. Véronneau S., Bernard H., Cloutier M., Courtemanche J., Ducharme L., Lefebvre A., Mason J. I., and LeHoux J. G. (1996) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **57**, 125-139
10. LeHoux J. G., Mason J. I., Bernard H., Ducharme L., LeHoux J., Véronneau S., and Lefebvre A. (1994) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **49**, 131-137
11. LeHoux J. G., Lefebvre A., Ducharme L., Lehoux J., Martel D., and Brière N. (1996) *J. Endocrinol.* **149**, 341-349
12. Tremblay A., and LeHoux J. G. (1992) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **41**, 799-808
13. Rainey W. E., Bird I. M., and Mason J. I. (1994) *Mol. Cell Endocrinol.* **100**, 45-50
14. LeHoux J. G., and Lefebvre A. (1998) *J. Mol. Endocrinol.* **20**, 183-191
15. Lehoux J. G., Fleury A., and Ducharme L. (1998) *Endocrinology* **139**, 3913-3922
16. Fleury A., Ducharme L., and LeHoux J. G. (1998) *J. Mol. Endocrinol.* **21**, 131-139

17. Coulombe N., Lefebvre A., and LeHoux J. G. (1996) *Endocr. Res.* **22**, 653-661
18. Coulombe N., Lefebvre A., and LeHoux J. G. (1997) *DNA Cell Biol.* **16**, 993-1002
19. Clyne C. D., Zhang Y., Slutsker L., Mathis J. M., White P. C., and Rainey W. E. (1997) *Mol. Endocrinol.* **11**, 638-649
20. Honda S. I., Morohashi K. I., and Omura T. (1990) *J. Biochem.* **108**, 1042-1049
21. Morohashi K. I., and Omura T. (1990) *J. Biochem.* **108**, 1050-1056
22. Gorman C. M., Moffat L. F., and Howard B. H. (1982) *Mol. Cell Biol.* **2**, 1044-1051
23. Bird I. M., Word A., Clyne C., Mason J. I., and Rainey W. E. (1995) *Hypertension* **25**, 1129-1134
24. Mouw A. R., Rice D. A., Meade J. C., Chua S. C., White P., Schimmer B. P., and Parker K. L. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 1305-1309
25. Hashimoto T., Morohashi K. I., Takayama K., Honda S. I., Wada T., Handa H., and Omura T. (1992) *J. Biochem.* **112**, 573-575
26. Morohashi K., Honda S., Inomata Y., Handa H., and Omura T. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 17913-17919
27. Mukai K., Imai M., Shimada H., and Ishimura Y. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 9130-9137
28. Rice D. A., Aitken L. D., Vandenbark G. R., Mouw A. R., Franklin A., Schimmer B. P., and Parker K. L. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 14011-1401
29. Bogerd A. M., Franklin A., Rice D. A., Schimmer B. P., and Parker K. L. (1990) *Mol. Endocrinol.* **4**, 845-850
30. Bird I. M., Neil A., Hanley R., Word R. A., Mathis J. M., McCarthy J. L., Mason J. I., and Rainey W. E. (1993) *Endocrinology* **133**, 1555-1561
31. Denner K., Rainey W. E., Pezzi V., Bird I. M., Bernhardt R., and Mathis J. M. (1996) *Mol. Cell Endocrinol.* **121**, 87-91

## FOOTNOTES

<sup>1</sup> The abbreviations used are: P450C11, P450 11 $\beta$ -hydroxylase; P450aldo, cytochrome P450 aldosterone synthase; DOC, deoxycorticosterone; ACTH, adrenocorticotropin; CAT, chloramphenicol acetyl transferase; PCR, polymerase chain reaction; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium; dBt cAMP, dibutyryl cyclic adenosin monophosphate; Ad4BP, Ad4 binding protein.

TABLE I

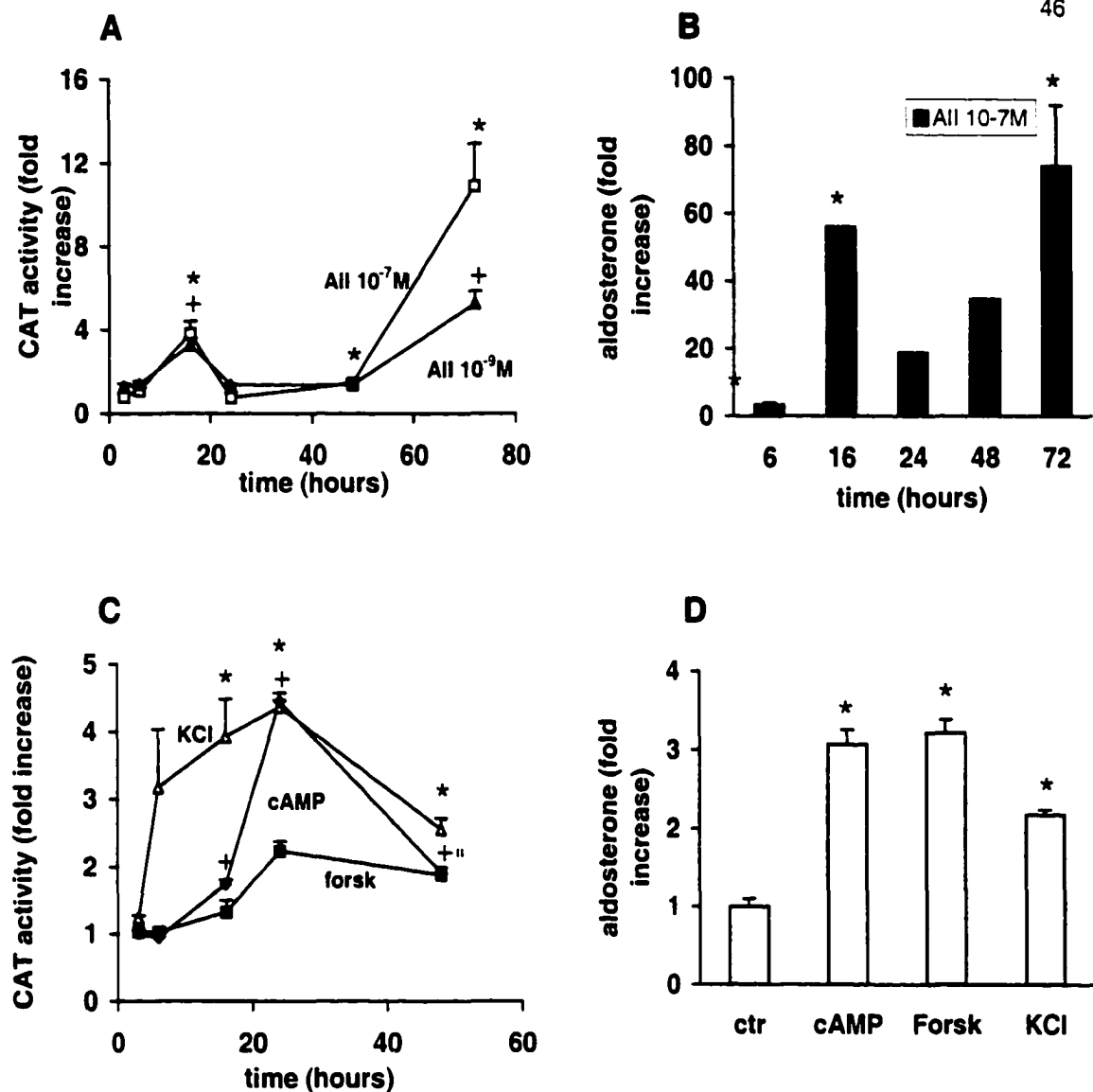
Effects of the calcium channel antagonist nifedipine on aldosterone output of NCI-H295 cells

72 hour treatment		24 hour treatment	
	Aldosterone (pmol/L)		Aldosterone (pmol/L)
Control	269 ± 70	Control	780 ± 79
Ang II	13137 ± 201	KCl	3176 ± 362
Ang II + nifedipine	5084 ± 712 <sup>a</sup>	KCl + nifedipine	904 ± 60 <sup>b</sup>
		cAMP	2850 ± 40
		cAMP + nifedipine	3269 ± 81
		Forskolin	2164 ± 86
		forskolin + nifedipine	2223 ± 15

Incubation media from experiments described in figure 5 were analyzed for aldosterone output. Each value shown is the mean ± SEM from six different media.

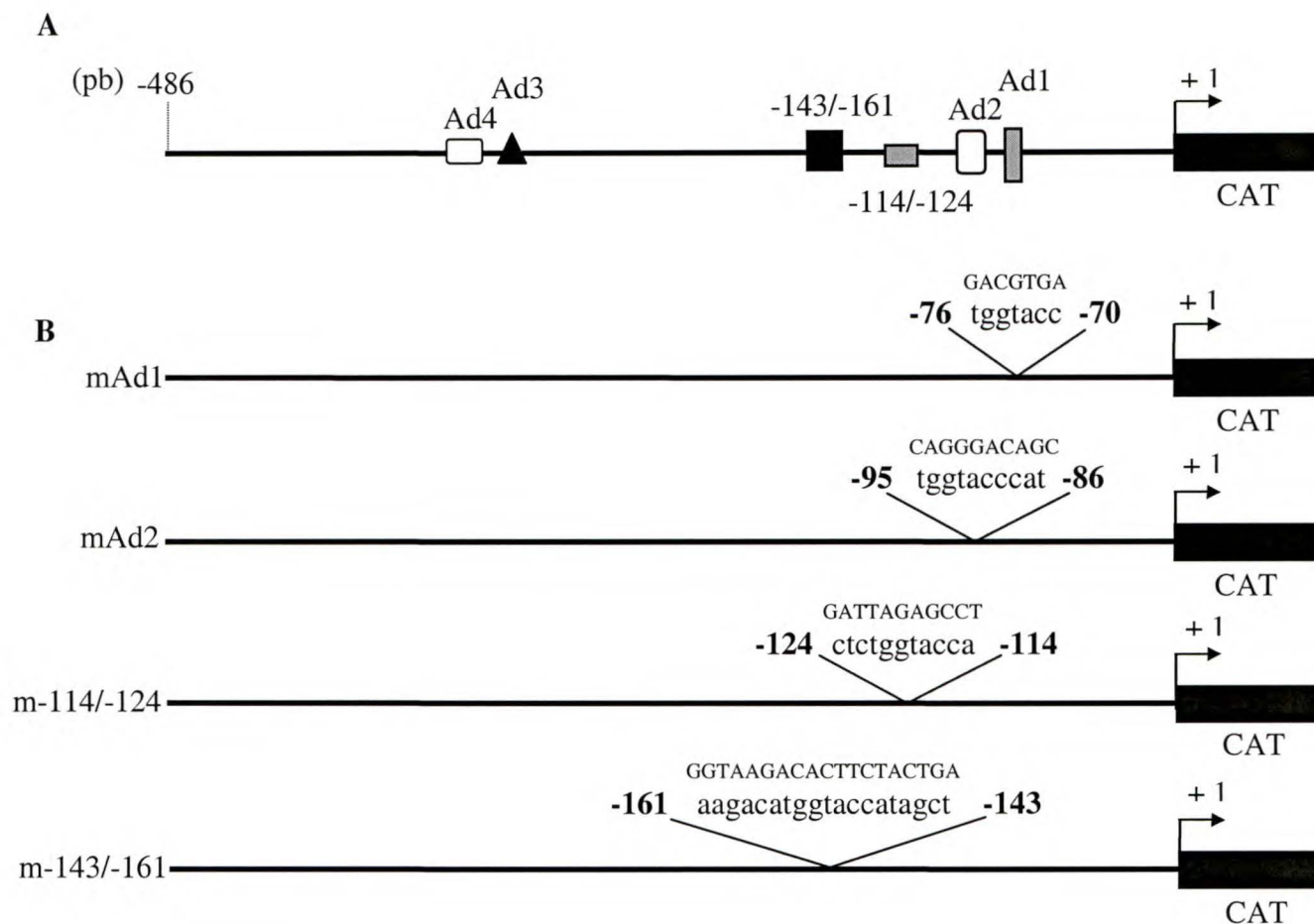
<sup>a</sup>  $P < 0.0005$  (compared to Ang II treatment alone)

<sup>b</sup>  $P < 0.005$  (compared to KCl treatment alone)

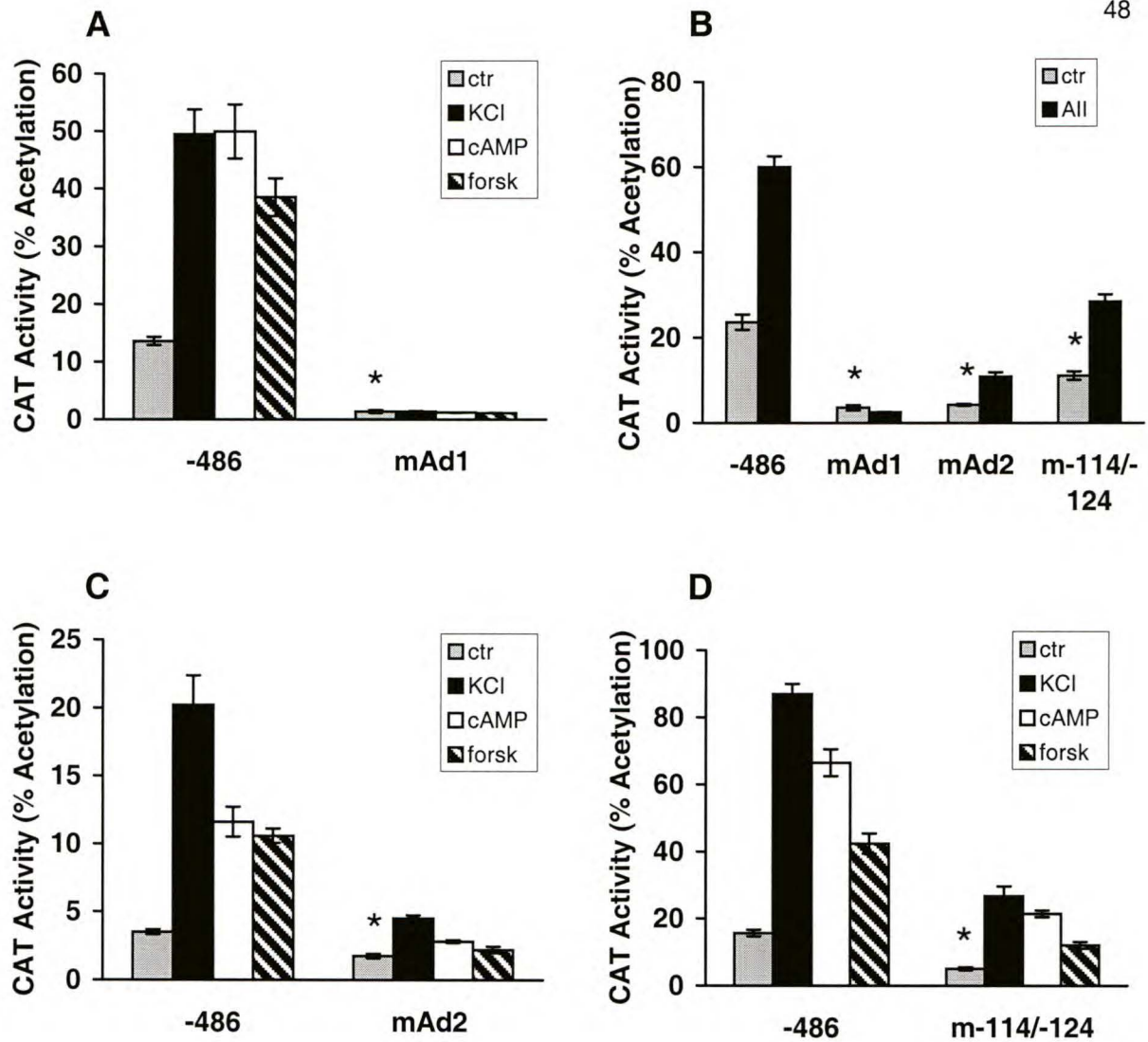


**FIG. 1.** Time course of *CYP11B2* reporter gene induction and aldosterone secretion. NCI-H295 cells were transiently transfected with 3.0  $\mu$ g pCAT reporter vector containing 486 bp of the hamster *CYP11B2* 5'-flanking DNA. After recovery, cells were treated with AII ( $10^{-7}$  M and  $10^{-9}$  M; Panel A) and with KCl, dBt cAMP and forskolin (16 mM, 1mM and 10  $\mu$ M respectively; Panel C) for the times indicated. Cells were lysed and assayed for CAT activity. Panel B represents the aldosterone secretion following treatment with AII ( $10^{-7}$  M) for the times indicated (medium was changed after 24 and 48 h). Panel D represents the aldosterone secretion following 24 h treatment with KCl (16 mM), dBt cAMP (1 mM) and forskolin (10  $\mu$ M). Each experimental value is compared to its own control incubated for the same time. Results are expressed as fold increases of the control and represent the mean  $\pm$  SEM of one experiment performed in triplicate; in Panel B, 24 and 48 h values are from a single analysis. For \*, + and ",  $P < 0.05$ . (In Panel C, \* is for KCl treatment, + is for dBt cAMP treatment and " is for forskolin treatment).

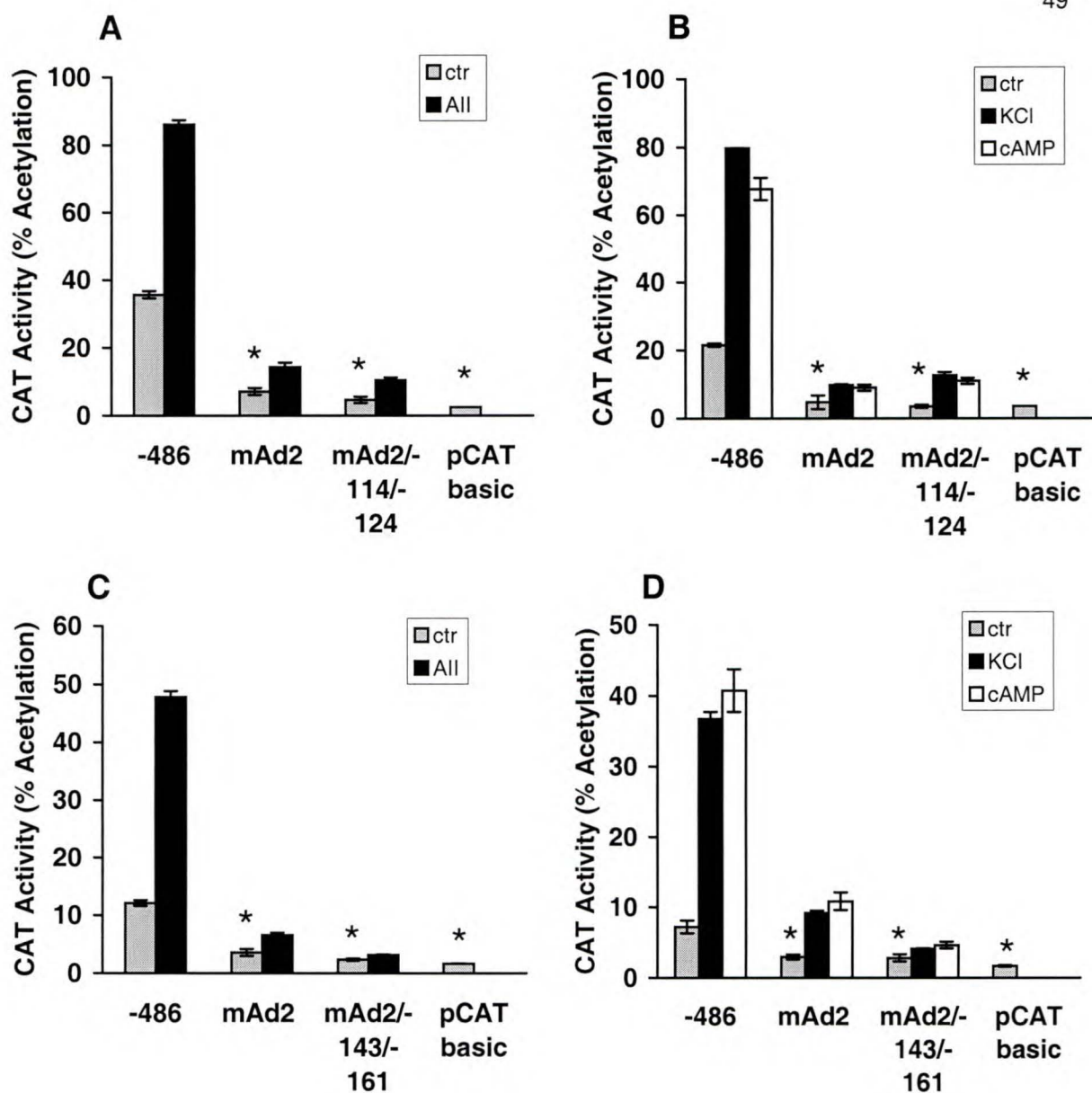




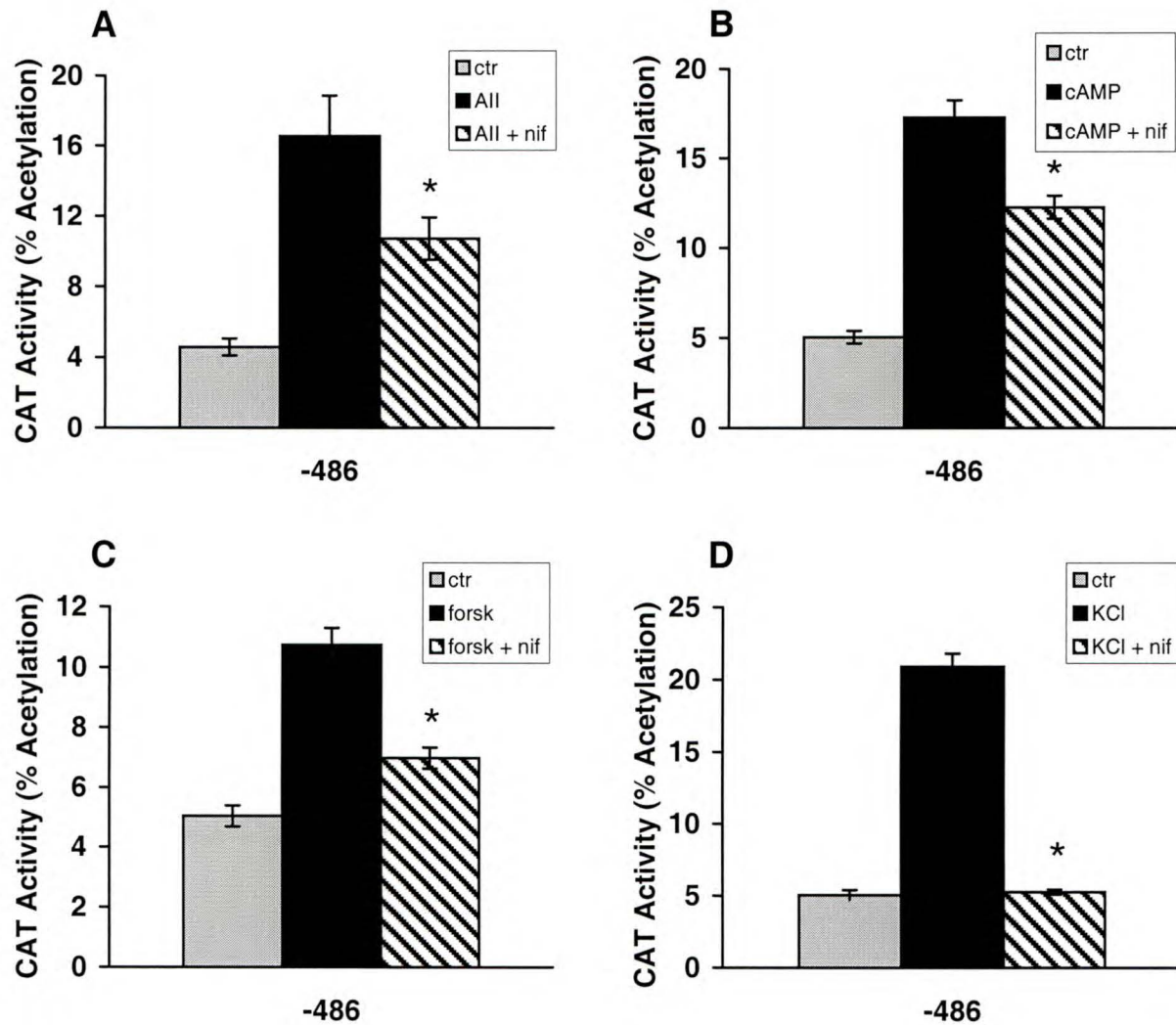
**FIG. 2.** Schematic representation of the 5'-flanking region of the hamster *CYP11B2* gene. Panel A shows the positions of putative elements involved in *CYP11B2* gene transcription. Panel B shows constructions of the mutants used in the different experiments and the bases that were changed. Uppercase letters represent the wild-type sequences and lowercase letters represent the mutated sequences.



**FIG. 3.** Analysis of putative Ad1, Ad2 and -114/-124 elements within the hamster *CYP11B2* promoter. NCI-H295 cells were transiently transfected with a wild-type *CYP11B2* construct (-486) or one containing a mutation in the Ad1, Ad2 or -114/-124 sequences. After recovery, cells were treated with: All (10<sup>-7</sup> M), KCl (16 mM), dBt cAMP (1 mM) and forskolin (10  $\mu$ M). Basal as well as stimulated CAT activities were determined. Results shown are the mean  $\pm$  SEM from experiments using three different plasmid preparations, each performed in triplicate. The basal CAT activity of the mutant constructs shown in Panels A, B, C and D were all significantly lower than that of the wild-type construct. \**P* < 0.05.



**FIG. 4.** Two double mutations in Ad2/-114/-124 and in Ad2/-143/-161 of the hamster *CYP11B2* promoter. NCI-H295 cells were transiently transfected with a construct containing wild-type *CYP11B2* (-486), a mutation in the Ad2 sequence, a double mutation in Ad2/-114/-124 or Ad2/-143/-161 or an empty plasmid containing no *CYP11B2* insert (pCAT basic). After recovery, cells were treated with All ( $10^{-7}$  M), KCl (16 mM) and dBt cAMP (1mM). Basal as well as stimulated CAT activities were determined. Results shown in Panels A and B are the mean  $\pm$  SEM from one experiment performed in triplicate. The results shown in Panels C and D are the mean  $\pm$  SEM from experiments using three different plasmid preparations, each performed in triplicate. The basal CAT activity of the mutant or pCAT basic constructs shown in Panels A, B, C and D were all significantly lower than that of the wild-type construct. \* $P < 0.05$ .



**FIG. 5.** Effects of nifedipine on the hamster *CYP11B2* gene transcriptional activity. NCI-H295 cells were transiently transfected with a wild-type *CYP11B2* construct (-486). After recovery, cells were treated with: All ( $10^{-7}$  M), KCl (16 mM), dBt cAMP (1mM) and forskolin (10  $\mu$ M) alone or in combination with nifedipine (nif) (10  $\mu$ M). Basal as well as stimulated CAT activities were determined. Results shown are the mean  $\pm$  SEM from experiments using three different plasmid preparations, each performed in triplicate. In the four conditions studied, the addition of nifedipine decreased the stimulated activities significantly. \* $P < 0.05$

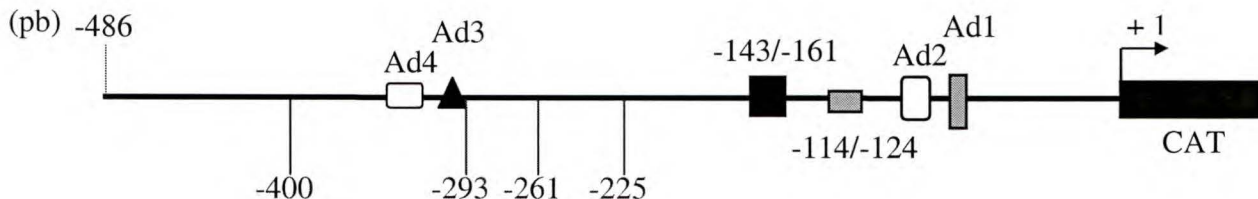


## **2-CHAPITRE 2:** Étude de la région inhibitrice du promoteur du gène *CYP11B2* de hamster.

### **2.1 INTRODUCTION**

Différentes études antérieures réalisées au laboratoire (Coulombe *et al*, 1997) (LeHoux et Lefebvre, 1998) avaient démontré que l'activité transcriptionnelle du promoteur du gène *CYP11B2* augmentait progressivement avec l'inclusion des éléments *cis* Ad1, Ad2, Ad5 et -143/-161 pb dans les cellules NCI-H295. De plus, une diminution significative de l'activité CAT a été observée avec la construction de -328 pb contenant l'élément suivant Ad3, indiquant la présence d'éléments *cis* inhibiteurs dans cette région. Finalement, l'activité CAT réaugmentait par la suite avec les constructions -350 pb (contenant Ad4), -486 pb, -2458 pb et -3722 pb.

Donc trois nouveaux plasmides de délétion du gène *CYP11B2* ont été construits dans la région comprise entre -161 pb et -328 pb afin de tenter de déterminer la présence de nouveaux éléments *cis* potentiellement inhibiteurs (Figure 6).



**FIGURE 6:** Représentation schématique des 4 constructions plasmidiques étudiées. Les trois premières constructions, -225, -261 et -293 pb, sont comprises entre les éléments -143/-161 pb et Ad3. La quatrième construction, -400 pb, est située en amont de la structure cruciforme.

## 2.2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.2.1 Construction des mutants de délétion

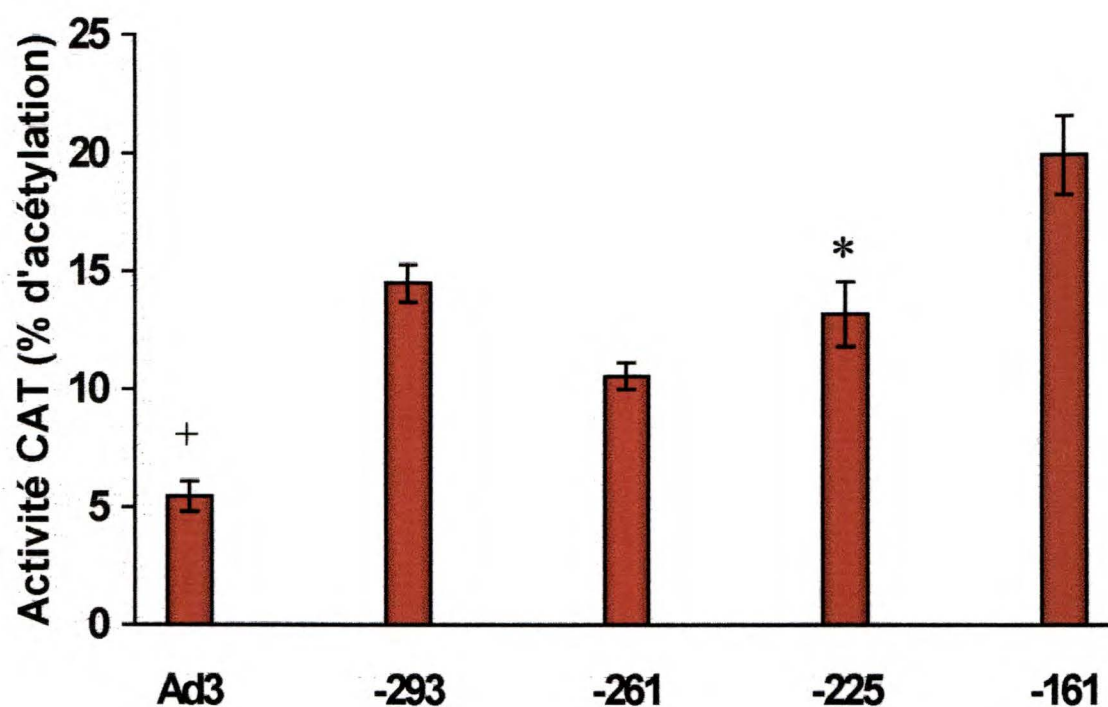
Les constructions plasmidiques contenant les délétions suivantes du promoteur *CYP11B2* de hamster, -400, -293, -261 et -225 pb, ont été fabriquées par *polymerase chain reaction* (PCR) en utilisant l'amorce commune antisens 5'-TTGGCTGCAGCC-CTCCCTACTCTGTCG-3', contenant un site de restriction PstI (souligné). Les amorces sens suivantes contenant un site de restriction SphI (souligné) ont été utilisées: 5'-GATCGCATGCAGATTTATTTTTTTTACTAAAGTC-3' (construction -400 pb), 5'-GATCGCATGCTTTCCAAGTATAGGGAGAAG-3' (construction -293 pb), 5'-GATCGCATGCGCCCCCTCTACTTCAGTC-3' (construction -261 pb) et 5'-GATCGCATGCGACACTATAGCTGTTTCCAG-3' (construction -225 pb). Les produits de PCR ont ensuite été digérés avec les enzymes de restriction appropriées, soient PstI et SphI, et insérés dans le vecteur pCAT-basic. La séquence des produits de PCR a été vérifiée par séquençage. (Les descriptions des cultures des cellules NCI-H295, des transfections transitoires et des essais de chloramphénicol acétyl transférase (CAT) sont expliquées au Chapitre 1).

## 2.3 RÉSULTATS

### **2.3.1 Expression de l'activité transcriptionnelle de base et stimulée de promoteurs tronqués du gène *CYP11B2***

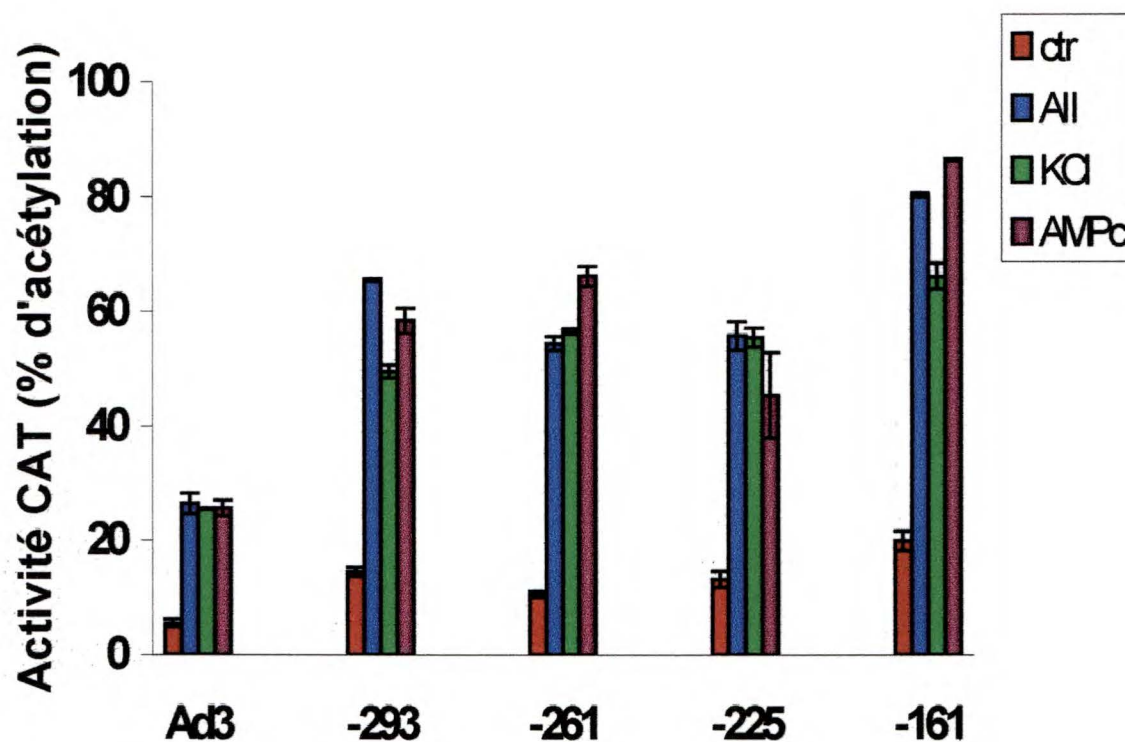
Une augmentation de la longueur du promoteur de -161 pb à -225 pb a résulté en une première diminution de 35% ( $p = 0.02$ ) de l'activité CAT basale (Figure 7). Par la suite, l'activité CAT semble demeurer stable avec les constructions de -261 pb et -293 pb jusqu'à l'inclusion de l'élément Ad3 qui provoque une baisse supplémentaire de 62% ( $p = 0.0004$ ) de l'activité basale comparée à celle de la construction de -293 pb. À la figure 8, il est possible d'observer que l'expression des cinq constructions plasmidiques a été stimulée significativement d'un facteur d'environ 5 fois en présence d'AII, de KCl et de dBt cAMP. Donc les baisses d'activité CAT stimulée entre -161 pb et -225 pb et entre -293 pb et la construction Ad3 seraient plutôt attribuées à des baisses d'activité basale correspondante.

Comme il a été mentionné précédemment, l'activité transcriptionnelle du gène *CYP11B2* augmente avec l'inclusion de l'élément suivant Ad4 (construction de -350 pb) jusqu'à la construction de -486 pb. Une des caractéristiques de cette région est observée à partir de -367 pb. Une séquence de 8 adénines et de 8 thymines séparée par une dizaine de nucléotides pourrait potentiellement former une structure cruciforme. Donc, un plasmide de délétion a été construit coupant la séquence du promoteur tout juste en amont de la structure cruciforme, soit à -400 pb. À la figure 9,



**FIGURE 7:** Activité transcriptionnelle basale obtenue avec les différentes constructions plasmidiques du gène *CYP11B2* de hamster. Les cellules NCI-H295 ont été transfectées avec les différentes constructions et incubées pendant 72 hrs. \* $P < 0.05$  (comparée à l'activité basale de la construction de -161 pb). + $P < 0.0005$  (comparée à l'activité basale de la construction de -293 pb).

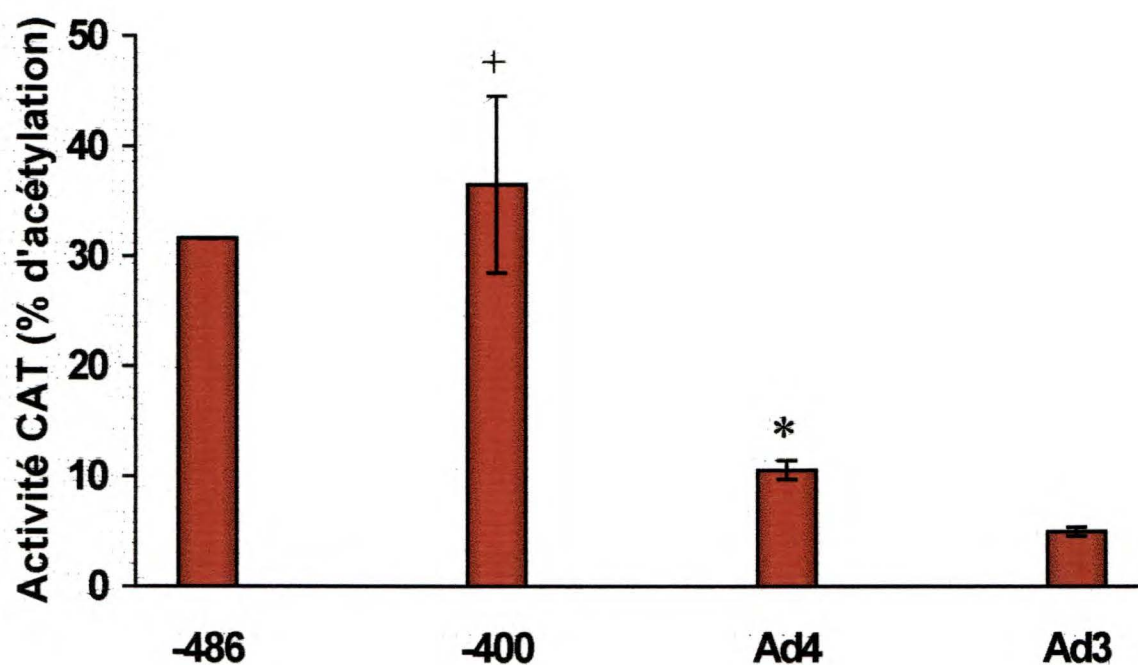




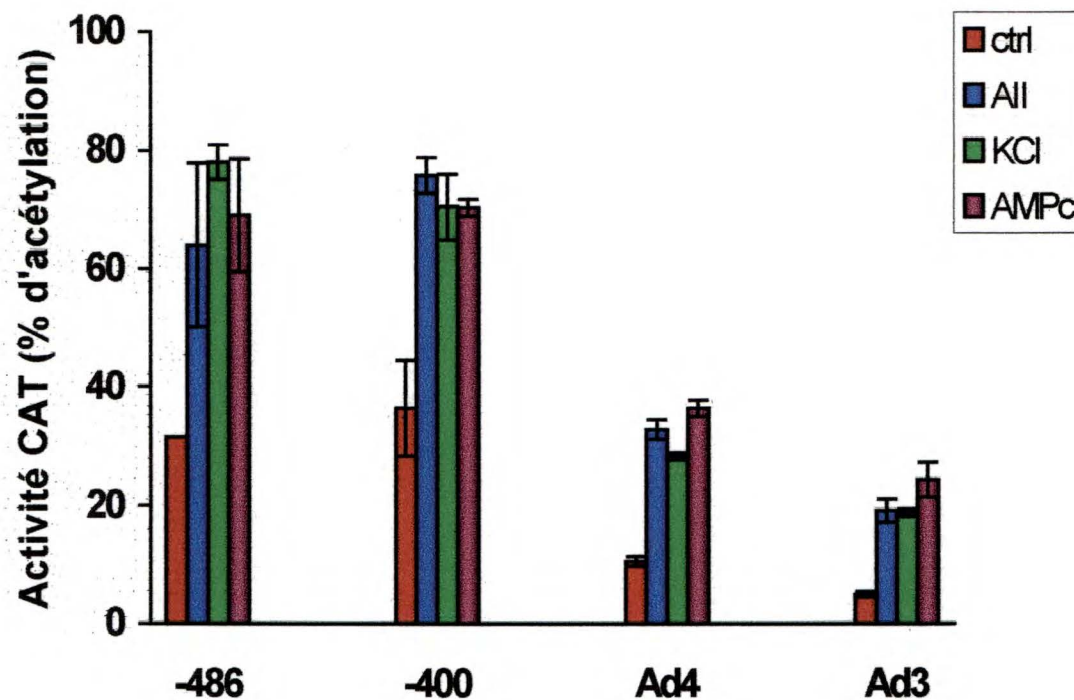
**FIGURE 8:** Activités transcriptionnelles basales et stimulées à l'AII, au KCl et à l'AMPC obtenues avec les différentes constructions plasmidiques du gène *CYP11B2* de hamster. Les cellules NCI-H295 ont été transfectées avec les différentes constructions et incubées seules (72 hrs) ou en présence d'AII 100 nM (72 hrs), de KCl 16 mM (24 hrs) ou de dBt cAMP 1 mM (24 hrs).

on observe que l'inclusion de l'élément Ad4 provoque une augmentation de l'activité CAT basale de 110% ( $p = 0.002$ ) par rapport à la construction Ad3. De plus, une augmentation de la longueur du promoteur à -400 pb, incluant donc la structure cruciforme, résulte en une hausse de l'activité basale de 240% ( $p = 0.02$ ) par rapport à la construction Ad4. Par la suite, l'activité demeure constante lorsque la longueur du promoteur est augmentée à -486 pb. Ces résultats suggèrent donc l'implication potentielle de la structure cruciforme dans cette réaugmentation de l'activité transcriptionnelle.

Encore une fois, on peut observer à la figure 10 que l'expression des quatre constructions plasmidiques a été stimulée d'un facteur semblable en présence d'AII, de KCl et de dBt cAMP. Les hausses d'activité CAT stimulée seraient donc dues aux hausses d'activité basale correspondante.



**FIGURE 9:** Activité transcriptionnelle basale obtenue avec les différentes constructions plasmidiques du gène *CYP11B2* de hamster. Les cellules NCI-H295 ont été transfectées avec les différentes constructions et incubées pendant 72 hrs. \* $P < 0.005$  (comparée à l'activité basale de la construction Ad3). <sup>+</sup> $P < 0.05$  (comparée à l'activité basale de la construction de Ad4).



**FIGURE 10:** Activités transcriptionnelles basales et stimulées à l'AII, au KCl et à l'AMPc obtenues avec les différentes constructions plasmidiques du gène *CYP11B2* de hamster. Les cellules NCI-H295 ont été transfectées avec les différentes constructions et incubées seules (72 hrs) ou en présence d'AII 100 nM (72 hrs), de KCl 16 mM (24 hrs) ou de dBt cAMP 1 mM (24 hrs).

## DISCUSSION

Différentes études antérieures menées au laboratoire ont permis d'isoler le gène *CYP11B2* de hamster. L'analyse de sa séquence a démontré la présence de 3722 pb de son promoteur en plus de ses neuf exons et de ses huit introns (Coulombe *et al.*, 1997). Des études de protection à la DNase I par un extrait nucléaire de surrénales de hamster sur le promoteur du gène *CYP11B2* ont permis d'identifier six éléments *cis* très conservés dans la région promotrice des gènes *CYP11B1* et *CYP11B2*, soit Ad1, Ad2, Ad3, Ad4, Ad5 et Ad6. De plus, un septième élément *cis* permettant une induction maximale dans les cellules NCI-H295 a été identifié (LeHoux et Lefebvre, 1998). En effet, la transfection des cellules NCI-H295 avec différents promoteurs tronqués du gène *CYP11B2* démontrait une induction maximale avec la construction contenant les éléments Ad1, Ad2, Ad5 et ce nouvel élément situé à -143/-161 pb. Finalement, l'inclusion de l'élément suivant, Ad3, provoquait une baisse substantielle de l'activité promotrice du gène, ce qui suggérait donc la présence d'autres éléments situés dans cette région.

Donc un des objectifs de la recherche consistait à étudier plus finement la région inhibitrice précédant l'élément Ad3. Trois plasmides de délétion, soient -225, -261 et -293 pb, ont été construits afin de comparer leur activité transcriptionnelle dans les cellules NCI-H295.

Lorsque l'activité transcriptionnelle de ces trois plasmides de délétion a été testée avec celle des constructions en aval (-161 pb) et en amont (-328 pb, contenant Ad3), deux baisses significatives d'activité basale ont été observées (Figure 7). Tout d'abord, une première baisse a été observée entre les constructions de -161 pb et de -225 pb. Par la suite, une certaine stabilité de l'activité promotrice a été observée entre les constructions de -225 pb et de -293 pb. Finalement, une deuxième baisse a été obtenue lors de l'ajout de l'élément suivant, soit Ad3. Ces résultats suggèrent donc premièrement la présence d'un élément inhibiteur dans la région précédant l'élément -143/-161 pb. En vérifiant des études faites chez d'autres espèces animales, une séquence inhibitrice potentielle a été montrée entre les éléments Ad4 et Ad5 du gène *cyp11b2* de souris (Bogerd *et al*, 1990). En alignant les séquences des promoteurs de hamster et de souris, on observe que cet élément putatif correspond à une séquence située en amont de la région -134/-161 pb de hamster mais la chevauchant sur cinq nucléotides (LeHoux et Lefebvre, 1998). Il est donc intéressant d'observer chez le hamster une région potentiellement inhibitrice ayant auparavant été observée chez une autre espèce. Par contre, une limite du système utilisée peut maintenant être mise en relief: lorsque la comparaison est effectuée entre les différents éléments des promoteurs de différentes espèces, il est important de bien tenir compte dans l'analyse du type cellulaire utilisé. En effet, il est fort possible sinon probable que l'interaction entre un élément et les protéines de liaison diffère d'un type cellulaire à un autre. Une régulation positive ou négative d'une région d'un gène pourrait dépendre de la présence, de l'absence ou des différences de concentrations des protéines reconnaissant

ces éléments entre les types cellulaires. C'est pourquoi une lignée capable de produire l'aldostérone, et donc, possédant tous les enzymes stéroïdogéniques nécessaires, a été utilisée (NCI-H295). Dans le cas présent, l'analyse de Bogerd *et al* (1990) sur le promoteur du gène *cyp11b2* de souris a été effectuée en utilisant comme système la lignée cellulaire de surrénales de souris Y1. Hors, il est connu que cette lignée ne peut produire de l'aldostérone, ce qui suggère la possibilité qu'il pourrait y avoir une déficience dans l'expression de plusieurs facteurs transcriptionnels impliqués dans l'expression des gènes stéroïdogéniques. C'est pourquoi il est difficile dans ce cas de comparer deux éléments putatifs provenant de deux gènes différents et, également, de deux études différentes.

Par la suite, l'observation des résultats indique une baisse très forte de l'activité basale entre les constructions de -293 pb et Ad3. Puisque le plasmide de délétion de -293 pb coupe tout juste en aval de l'élément Ad3, ceci semble suggérer que la simple inclusion de l'élément Ad3 provoque cette baisse drastique de l'activité basale. Des études sont présentement effectuées au laboratoire de façon à muter les nucléotides de cet élément et d'observer par la suite s'il y a suppression de cette inhibition.

L'autre partie du promoteur du gène *CYP11B2* de hamster qui a été étudiée à l'aide des plasmides de délétion est la séquence palindromique contenue dans la région -398/-367 pb. Des études antérieures avaient démontré que l'activité transcriptionnelle était augmentée significativement entre les constructions de -350 pb (contenant Ad4) et de -486 pb (LeHoux et Lefebvre, 1998). Un plasmide de délétion a donc été construit coupant tout juste en amont du palindrome, soit à -400 pb. L'activité transcriptionnelle

de ce plasmide de délétion a donc été testée avec celle des constructions en aval (Ad4) et en amont (-486 pb) (Figure 9). Une première augmentation de l'activité basale a été observée entre les constructions Ad3 et Ad4, confirmant un résultat ayant déjà été obtenu précédemment (LeHoux et Lefebvre, 1998). Par la suite, une forte augmentation de l'activité promotrice est observée entre les constructions Ad4 et de -400 pb. Finalement, l'activité demeure stable entre les constructions de -400 pb et de -486 pb. Ce résultat suggère donc que l'inclusion de la séquence palindromique (pouvant potentiellement former une structure cruciforme) pourrait être responsable de cette augmentation significative de l'activité transcriptionnelle de base en amont de l'élément Ad4. Encore une fois, des travaux sont effectués au laboratoire de façon à construire un plasmide de délétion coupant tout juste en aval du palindrome (-366 pb). L'activité transcriptionnelle de ce dernier sera ensuite comparée à celle des constructions Ad4 et de -400 pb et il sera donc possible de déterminer si le palindrome est responsable de cette augmentation d'activité transcriptionnelle.

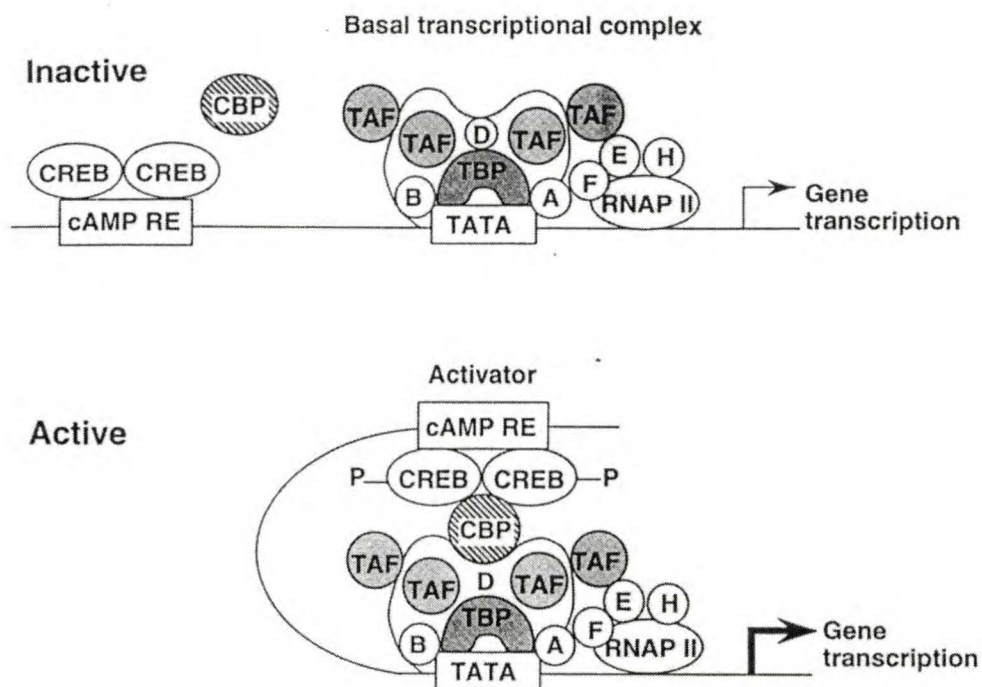
L'addition d'AII, de KCl (stimule l'entrée de calcium intracellulaire) et de dBt cAMP (stimule la voie des PKA) a eu pour effet de stimuler d'un facteur semblable l'expression du gène reporteur de toutes les constructions plasmidiques (Figures 8 et 10). Comme il a été mentionné précédemment dans la section des résultats, les différences d'activité CAT stimulée entre les plasmides de délétion seraient plutôt attribuées à des différences d'activité basale correspondante.

D'après les différents résultats obtenus tout au long des recherches, il semble que la stimulation de l'activité du promoteur du gène *CYP11B2* ne dépende pas du stimulateur



utilisé (AII, KCl, AMPc et forskoline). En effet, que ce soit par mutagenèse des éléments (Ad1, Ad2 et -114/-124) ou bien par délétion de parties du promoteur (-400, -293, -261 et -225 pb), la stimulation était semblable peu importe le traitement utilisé. Seule la mutation de l'élément Ad2 a provoqué une différence selon les traitements alors qu'elle a eu pour effet d'atténuer l'action stimulatrice du KCl, de l'AMPc et de la forskoline mais non celle de l'AII. Il est donc possible que le(s) facteur(s) de transcription (toujours inconnu(s)) se liant à cet élément ai(en)t une spécificité pour une réponse au KCl et à l'AMPc.

Lorsque l'on observe le promoteur du gène *CYP11B2* de hamster, on peut le comparer à un promoteur eucaryote typique. En effet, il possède une boîte TATA, qui permet la liaison des facteurs TFII et de l'ARN polymérase II, ainsi que l'élément CRE-like Ad1, qui permet la liaison de la protéine CREB. Après phosphorylation de cette dernière, il y a recrutement du co-activateur *CREB-binding protein* (CBP) qui permet un couplage entre les complexes formés à la boîte TATA et à l'élément Ad1 (Figure 11). (Ex: promoteurs de la somatostatine (Montminy et Bilezikjian, 1987) et de *CYP11B1* (Bogerd et al, 1990)).



**FIGURE 11:** Représentation schématique des protéines transcriptionnelles basales d'un promoteur eucaryote typique. A, le promoteur n'est pas activé, résultant en une transcription basale et B, le promoteur est activé par une phosphorylation de CREB et par le recrutement de CBP, résultant en une transcription plus élevée. (Wilson, Foster, Kronenberg, Larsen (1998). Williams textbook of endocrinology. 9<sup>th</sup> Edition, WB Saunders C<sup>ie</sup>)

Des études antérieures ont montré que cette protéine CREB engendrant le couplage pouvait être phosphorylée par la PKA (stimulée par l'AMPc et la forskoline) ainsi que par la PKC (stimulée par l'AII) *in vitro* (Rice *et al*, 1989). De plus, il est déjà connu

que les protéines Ad4BP et COUP-TF sont capables de lier plusieurs des éléments du promoteur du gène *CYP11B2* (Clyne *et al*, 1997). Selon les résultats obtenus, une spécificité selon les traitements n'a pas été obtenue lorsque ces éléments ont été mutés ou enlevés. Comment expliquer cette observation? Mentionnons tout d'abord que l'utilisation des cellules NCI-H295 pour l'étude permet de fournir toutes les protéines activatrices requises (Clyne *et al*, 1997). De plus, il est fort probable sinon certain que les différentes protéines nommées ci-haut jouent un rôle dans la stimulation de l'activité promotrice, et ceci, peu importe le stimulateur utilisé. Par contre, plusieurs éléments supplémentaires entrent en jeu lors de l'analyse de la situation *in vivo*. Premièrement, la disponibilité des différentes protéines impliquées dans une cascade de réaction en réponse à un stimulateur peut varier énormément selon le contexte dans lequel se trouve la cellule. Ensuite, il est fort probable que plusieurs autres éléments de contrôle participant à la régulation de l'expression du gène ne soient pas présents dans les 486 premières paires de bases en amont du site d'initiation de transcription. Ces autres éléments pourraient potentiellement être situés dans la partie 5' du promoteur, dans les introns, les exons ou bien dans la partie 3' du gène. Finalement, la quantité de récepteurs spécifiques à chaque stimulateur présents à la membrane de la cellule peut varier, de même que la concentration calcique extra- et intra-cellulaire. Ces facteurs contribuent donc certainement à l'obtention d'une réponse spécifique et c'est pourquoi de multiples études sont toujours en cours dans le but d'obtenir de l'information supplémentaire quant au contrôle de l'expression de ce gène.

En conclusion, l'étude a permis de déterminer que la région 5' non transcrite du gène *CYP11B2* de hamster possédait une activité transcriptionnelle pouvant être contrôlée par l'AII, le KCl, le dBt cAMP et la forskoline dans les cellules NCI-H295. Les résultats suggèrent également que ce gène est régulé du moins en partie par la voie de signalisation des PKA et par les canaux calciques. Il a aussi été montré que l'élément *cis* Ad1 était essentiel à l'expression du gène *CYP11B2*, mais que les éléments Ad2, -114/-124 et -143/-161 participaient également à l'activité transcriptionnelle basale et stimulée du gène. Finalement, la présence de deux éléments *cis* régulant négativement l'activité promotrice a été révélée dans la région comprise entre -161 et -328 pb du gène *CYP11B2* de hamster.

## REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier le Dr Jean-Guy LeHoux de m'avoir accepté dans son laboratoire pour me permettre de travailler sur un sujet des plus intéressants pendant ma maîtrise. J'aimerais également le remercier pour le support financier qu'il m'a accordé pendant mes études.

J'aimerais ensuite remercier Andrée Lefebvre avec qui j'ai entamé mon projet de recherche et qui m'a permis de développer d'excellentes aptitudes scientifiques dès le départ. J'aimerais aussi remercier Lyne Ducharme et Geneviève Garon pour leur soutien autant au niveau professionnel qu'amical.

Finalement, j'aimerais spécialement remercier mes collègues et amis Axel Mathieu, Alain Fleury et Jean Courtemanche pour avoir rendu mémorable la conférence *Adrenal Cortex* d'Orford en juin 1998. Je garderai également longtemps en mémoire tous les midis de *babyfoot* et toutes les soirées *Quakenights* s'étant terminées aux petites heures de la nuit. Merci les gars.

## RÉFÉRENCES

- Abayasekara DRE., Vazir H., Whitehouse BJ., Price GM., Hinson JP., Vinson GP. (1989). Studies on the mechanisms of ACTH-induced inhibition of aldosterone biosynthesis in the rat adrenal cortex. *J. Endocrinol.* **122**, 625-632.
- Addison T. (1855). On the Constitutional and Local Effects of Disease of the Supra-Renal Capsules. London : Highley.
- Ahlgren R., Suske G., Waterman MR., Lund J. (1999). Role of Spl in cAMP-dependant transcriptional regulation of the bovine *CYP11A* gene. *J. Biol. Chem.* **27**, 19422-19428.
- Arnold J. (1866). Ein Beitrag zu der feineren Structur und dem Chemismus der Nebennieren. *Arch. Pathol. Anat. Physiol. Klin. Med.* **35**, 64-107.
- Berkowitz L., Gilman MZ. (1990). Two distinct forms of active transcription factor CREB. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**, 5258-5262.
- Bird IM., Hanley NA., Word RA., Mathis JM., McCarthy JL., Mason JL., Rainey WE. (1993). Human NCI-H295 adrenocortical carcinoma cells: a model for angiotensin II-responsive aldosterone secretion. *Endocrinology.* **133**, 1555-1561.
- Bird IM., Word A., Clyne C., Mason JL., Rainey WE. (1995). Potassium negatively regulates angiotensin II type 1 receptor expression in human adrenocortical H295R cells. *Hypertension.* **25**, 1129-1134.
- Bogerd AM., Franklin A., Rice DA., Schimmer BP., Parker KL. (1990). Identification and characterization of two upstream elements that regulate adrenocortical expression of steroid 11 $\beta$ -hydroxylase. *Mol. Endocrinol.* **4**, 845-850.
- Bolté E., Coudert S., Lefebvre Y. (1967). Steroid production from plasma cholesterol. II. *In vivo* conversion of plasma cholesterol to ovarian progesterone and adrenal C<sup>19</sup> and C<sup>21</sup> steroids in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **38**, 394-400.
- Boon WC., Roche PJ., Hammond VE., Jeyaseelan K., Crawford RJ., Coghlan JP. (1995). Cloning and expression analysis of a cytochrome P45011 $\beta$  cDNA in sheep. *Biochim. Biophys. Acta* **1260**, 109-112.

Brown-Séquard CE. (1856). Recherches expérimentales sur la physiologie et la pathologie des capsules surrénales. *Arch. Gen. Med.* **8**, 385-401.

Chanderbhan R., Tanaka T., Strauss JF., Irwin D., Noland BJ., Scallen TJ., Vahouny GV. (1983). Evidence for sterol-carrier protein 2-like activity in hepatic, adrenal and ovarian cytosol. *Biochem. Biophys Res. Commun.* **117**, 702-709.

Clyne CD., Zhang Y., Slutsker L., Mathis JM., White PC., Rainey WE. (1997). Angiotensin II and potassium regulate human *CYP11B2* transcription through common cis-elements. *Mol. Endocrinol.* **11**, 638-649.

Coulombe N., Lefebvre A., LeHoux JG. (1997). Characterization of the hamster *CYP11B2* gene encoding adrenal cytochrome P450 aldosterone synthase. *DNA Cell Biol.* **8**, 993-1002.

Curnow KM., Tusie-Luna MT., Pascoe L., Natarajan R., Gu JL., Nadler JL., White PC. (1991). The product of the *CYP11B2* gene is required for aldosterone biosynthesis in the human adrenal cortex. *Mol. Endocrinol.* **5**, 1513-1522.

Denner K., Rainey WE., Pezzi V., Bird IM., Bernhardt R., Mathis JM. (1996). Differential regulation of 11 $\beta$ -hydroxylase and aldosterone synthase in human adrenocortical H295R cells. *Mol. Cell Endocrinol.* **121**, 87-91.

Domalik LJ., Chaplin DD., Kirman MS., Wu RC., Liu W., Howard TA., Seldin MF., Parker KL. (1991). Different isozymes of mouse 11 $\beta$ -Hydroxylase produce mineralocorticoids and glucocorticoids. *Mol. Endocrinol.* **5**, 1853-1861.

Gazdar AF., Oie HK., Shackleton CH., Chen TR., Triche TJ., Myers CE., Chrousos GP., Brennan MF., Stein CA., La Rocca RV. (1990). Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis. *Cancer Res.* **50**, 5488-5496.

Gwynne JT., Strauss JF. (1982). The role of lipoprotein in steroidogenesis and cholesterol metabolism in steroidogenic glands. *Endocr. Rev.* **3**, 299-329.

Hashimoto T., Morohashi KI., Takayama K., Honda SI., Wada T., Handa H., Omura T. (1992). Cooperative transcription activation between Ad1, a CRE-like element, and other elements in the *CYP11B* gene promoter. *J. Biochem.* **112**, 573-575.

Honda SI., Morohashi KI., Nomura M., Takeya M., Kitajima M., Omura T. (1993). Ad4BP regulating steroidogenic P450 genes is a member of steroid hormone receptor superfamily. *J. Biol. Chem.* **268**, 7479-7502.

- Honda SI., Morohashi KI., Omura T. (1990). Novel cAMP regulatory elements in the promoter region of bovine P450(11 $\beta$ ) gene. *J. Biochem.* **108**, 1042-1049.
- Imai M., Shimada H., Okada Y., Matsushima-Hibiya Y., Ogishima T., Ishimura Y. (1990). Molecular cloning of a cDNA encoding aldosterone synthase cytochrome P450 in rat adrenal cortex. *FEBS Lett.* **263**, 299-302.
- Kirita S., Hashimoto T., Kitajima M., Honda S., Morohashi K., Omura T. (1990). Structural analysis of multiple bovine P-450(11 beta) genes and their promoter activities. *J. Biochem.* **108**, 1030-1041.
- Kominami S., Ochi H., Koboyashi T., Takemori S. (1980). Studies on the steroid hydroxylation system in adrenal cortex microsomes: purification and characterization of the cytochrome P450 specific for steroid 21 hydroxylation. *J. Biol. Chem.* **255**, 3386-3394.
- Lancisius B. (1774). *Tabulae Anatomicae* (Eustachius B), ed. Amsterdam.
- Lavorgna G., Ueda H., Clos J., Wu C. (1991). FTZ-F1, a steroid hormone receptor-like protein implicated in the activation of *fushi-tarazu*. *Science*. **252**, 848-851.
- LeHoux JG., Lefebvre A. (1998). Transcriptional activity of the hamster *CYP11B2* promoter in NCI-H295 cells stimulated by angiotensin II, potassium, forskolin and bisindolylmaleimide. *J. Mol. Endocrinol.* **20**, 183-191.
- LeHoux JG., Mason JL., Bernard H., Ducharme L., LeHoux J., Véronneau S., Lefebvre A. (1994). The presence of two cytochrome P450 aldosterone synthase mRNAs in the hamster adrenal. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **49**, 131-137.
- Lin D., Sugawara T., Strauss JF., Clark BJ., Stocco DM., Saenger P., Rogol A., Miller WL. (1995). Role of steroidogenic regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Science*. **267**, 1828-1831.
- Liu Z., Simpson ER. (1997). Steroidogenic factor 1 (SF-1) and Sp1 are required for regulation of bovine *CYP11A* gene expression in bovine luteal cells and adrenal Y1 cells. *Mol. Endocrinol.* **2**, 127-137.
- Lund J., Bakke M., Mellgren G., Morohashi KI., Doskeland SO. (1997). Transcriptional regulation of the bovine *CYP17* gene by cAMP. *Steroids*. **62**, 43-45.
- Miller WL. (1988). Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr. Rev.* **9**, 295-318.



- Montminy MR., Bilezikjian LM. (1987). Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. *Nature*. **328**, 175-178.
- Mornet E., Dupont J., White PC. (1989). Characterization of two genes encoding human steroid 11 $\beta$ -Hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **26**, 20961-20967.
- Morohashi K., Honda S., Inomata Y., Handa H., Omura T. (1992). A common *trans*-acting factor, Ad4-binding protein, to the promoters of steroidogenic P450s. *J. Biol. Chem.* **267**, 17913-17919.
- Morohashi KI., Nonaka Y., Kirita S., Hatano S., Takakusu A., Okamoto M., Omura T. (1990). Enzymatic activities of P450(11 $\beta$ )s expressed by two cDNAs in COS-7 cells. *J. Biochem.* **107**, 635-640.
- Morohashi KI., Omura T. (1990). Tissue-specific transcription of P450(11 $\beta$ ) gene *in vitro*. *J. Biochem.* **108**, 1050-1056.
- Morohashi KI., Zanger UM., Honda SI., Hara M., Waterman MR., Omura T. (1993). Activation of *CYP11A* and *CYP11B* gene promoters by the steroidogenic cell-specific transcription factor, Ad4BP. *Mol. Endocrinol.* **9**, 1196-1203.
- Mouw AR., Rice DA., Meade JC., Chua SC., White P., Schimmer BP., Parker KL. (1989). Structural and functional analysis of the promoter region of the gene encoding mouse steroid 11 $\beta$ -hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **264**, 1305-1309.
- Mukai K., Imai M., Shimada H., Ishimura Y. (1993). Isolation and characterization of rat *CYP11B* genes involved in late steps of mineralo- and glucocorticoid synthesis. *J. Biol. Chem.* **268**, 9130-9137.
- Müller J. (1988). Regulation of aldosterone biosynthesis. Physiological and clinical aspects. *Monogr. Endocrinol.* **29**, Springer Verlag, Berlin.
- Müller J. (1995). Aldosterone: The minority hormone of the adrenal cortex. *Steroids*. **60**, 2-9.
- Papadopoulos V., Berkovich A., Krueger KE., Costa E., Guidotti A. (1991). Diazepam binding inhibitor and its processing products stimulate mitochondrial steroid biosynthesis via an interaction with mitochondrial benzodiazepine receptors. *Endocrinology*. **129**, 1481-1488.

Rhéaume E., Lachance Y., Zhao HF., Breton N., Dumont M., de Launoit Y., Trudel C., Luu-The V., Simard J., Labrie F. (1991). Structure and expression of a new complementary DNA encoding the almost exclusive  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$  in human adrenals and gonads. *Mol. Endocrinol.* **5**, 1147-1157.

Rice DA., Aitken LD., Vandenbark GR., Mouw AR., Franklin A., Schimmer BP., Parker KL. (1989). A cAMP-responsive element regulates expression of the mouse steroid  $11\beta$ -hydroxylase gene. *J. Biol. Chem.* **264**, 14011-14015.

Schoenwetter HP. (1968). Zur Vorgeschichte der Endokrinologie, Zuercher Medizingeschichtliche Abhandlungen. **61**.

Swingle WW., Pfiffner JJ. (1931). Studies on the adrenal cortex : I. The effect of a lipid fraction upon the life-span of adrenalectomized cats. *Am. J. Physiol.* **96**, 153-163.

Tsukiyama T., Ueda H., Hirose H., Niwa W. (1992). Embryonal long terminal repeat-binding protein is a murine homolog of FTZ-F1, a member of the steroid receptor superfamily. *Mol. Cell Biol.* **12**, 1286-1291.

Wang HP., Kimura T. (1976). Purification and characterization of the adrenal cortex mitochondrial cytochrome P450 specific for cholesterol side-chain cleavage activity. *J. Biol. Chem.* **251**, 6068-6074.

Waterman MR., Kagawa N., Zanger UM., Momoi K., Lund J., Simpson ER. (1992). Comparison of cAMP-responsive DNA sequences and their binding proteins associated with expression of the bovine *CYP17* and *CYP11A* and human *CYP21b* genes. *J. Ster. Biochem. Mol. Biol.* **43**, 931-935.

Wheeler TD., Vincent S. (1917). The question as to the relative importance to life of the cortex and medulla of the adrenal bodies. *Trans. R. Soc. Can.* **11**, 125-127.

White PC., Chaplin DD., Weis JH., Dupont B., New MI., Seidman JG. (1984). Two steroid 21-hydroxylase genes are located in the murine S region. *Nature.* **312**, 465-467.

White PC., New MI., Dupont B. (1984). HLA-linked congenital adrenal hyperplasia results from a defective gene encoding a cytochrome P450 specific for steroid 21-hydroxylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**, 7505-7509.

Yanagibashi K., Haniu M., Shively JE., Shen WH., Hall P. (1986). The synthesis of aldosterone by the adrenal cortex. Two zones (fasciculata and glomerulosa) possess one enzyme for 11 beta-, 18-hydroxylation, and aldehyde synthesis. *J. Biol. Chem.* **261**, 3556-3562.

## **ANNEXES**

### **Communication**

**Sarazin, P.**, Lefebvre, A. et LeHoux, JG. Characterisation of the hamster *CYP11B2* gene regulatory region. VIII<sup>th</sup> adrenal cortex conference, Scientific program and abstracts, June 13-16, 1998: Orford, Quebec. p.49.

### **Publication**

**Sarazin P.**, Lefebvre A. and LeHoux JG. 1998 The role of calcium channels in hamster *CYP11B2* gene expression. *Endocrine Research* 24(3-4): 633-636.